

Biologicas

331

T.D.

ANALISIS MOLECULAR DE LA REGION *zerknüllt* DEL  
COMPLEJO ANTENNAPEDIA DE *D.subobscura*.

MEMORIA PRESENTADA POR JAVIER TEROL ALCAYDE PARA OPTAR  
AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS DE LA  
UNIVERSIDAD DE VALENCIA



VALENCIA 10 DE ENERO DE 1994

UMI Number: U607682

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607682

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.  
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against  
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC  
789 East Eisenhower Parkway  
P.O. Box 1346  
Ann Arbor, MI 48106-1346

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
BIBLIOTECA CIÈNCIES

→ Biológicas

Nº Registre 6411

DATA 23.3.94

SIGNATURA

331.T.D

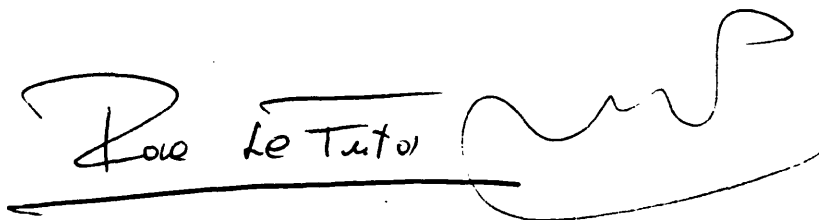
Nº LIBRS: j2164455x

30cms.

D<sup>a</sup> Rosa de Frutos Illán, Catedrática del Departamento de Genética de la facultad de Ciencias Biológicas y D. Manuel Pérez Alonso, Profesor Ayudante del mismo Departamento,

CERTIFICAN: Que la memoria titulada "Caracterización molecular de la región *zerknüllt* del Complejo Antennapedia de *D.subobscura*", ha sido realizada bajo su codirección, en este Departamento, por Javier Terol Alcayde, Licenciado en Ciencias Biológicas.

Para que conste, en cumplimiento de la legislación vigente, firman el presente certificado en Valencia a 10 de Enero de 1994.

The image shows two handwritten signatures in black ink. The signature on the left is 'Rosa de Frutos Illán' and the one on the right is 'Manuel Pérez Alonso'. Both signatures are written in a cursive, flowing style. Below the signatures, there are two horizontal lines, one under each signature, indicating the space for printed names.

Fdo. Rosa de Frutos Illán

Fdo. Manuel Pérez Alonso





# ÍNDICE





# ÍNDICE

1. Introducción	5
1.1. el complejo <i>Antennapedia</i>	8
1.1. Los complejos de genes homeóticos y la evolución	11
1.3. <i>D.melanogaster</i> , un modelo que no lo es tanto	13
1.2. Determinación del eje dorsoventral en <i>Drosophila</i>	16
1.2.1. El sistema dorsoventral divide al embrión en tipos celulares	16
1.2.2. Los genes maternos establecen un gradiente dorsoventral en el embrión	17
1.2.3. El patrón dorsoventral está determinado por un gradiente proteicos	19
1.2.4. Los genes zigóticos controlan la diferenciación dorsoventral	24
1.2.5. <i>twist</i> y <i>snail</i> regulan la formación del mesodermo	25
1.2.6. <i>decapentaplegic</i> actúa como un morfógeno en la región dorsal	26
1.2.8. <i>tolloid</i> y <i>shrew</i> contribuyen a la formación del gradiente dpp	27
1.3. El gen <i>zerknüllt</i>	28
1.3.1. La amnioserosa	28
1.3.2. Las mutaciones <i>zen</i> causan la pérdida de la amnioserosa	29
1.3.3. Estructura molecular del gen <i>zerknüllt</i>	29
1.3.4. La expresión de <i>zen</i> está restringida a la región dorsal	30
1.3.5. <i>zen</i> está regulado en los polos del embrión por genes del si	32
1.3.6. El problema del gen <i>z2</i>	33
1.4. La comparación entre especies: una aproximación evolutiva a u	34
1.4.1. Comparación de secuencias codificantes	34
1.4.2. Comparación de secuencias no codificantes	36
1.4.3. Comparación de patrones de expresión	37
2. Objetivos	40
3. Materiales y métodos	43
3.1. Material biológico	45
3.1.1. <i>Drosophila</i>	45
3.1.2. <i>E. coli</i>	45
3.2. Vectores de clonación	45
3.2.1. EMBL4	45
3.2.2. pUC18 y pUC19	45
3.3. Sondas utilizadas	46
3.3.1. Sondas procedentes de <i>D.melanogaster</i>	46
3.3.2. Sondas procedentes de <i>D.subobscura</i>	46
3.3.3. Oligonucleótidos	46
3.4. Extracción de ácidos nucleicos	46
3.4.1. DNA genómico de <i>Drosophila</i>	47
3.4.2. DNA plasmídico	47
3.4.3. DNA de bacteriófago $\lambda$	47
3.5. Marcaje de DNA	48
3.6. Hibridación de ácidos nucleicos	48
3.6.1. Hibridación en filtro	48
3.6.1.1. Condiciones de hibridación	48
3.6.1.2. Condiciones de lavado	48
3.6.1.3. Detección	49
3.6.2. Hibridaciones <i>in situ</i>	49
3.6.2.1. Hibridaciones <i>in situ</i> en embriones de <i>Drosophila</i>	49
3.6.2.2. Hibridación <i>in situ</i> sobre cromosomas politénicos de <i>D.subobscura</i>	50
3.7. Clonación de DNA en <i>E. coli</i>	50
3.7.1. Preparación del vector de clonación	50
3.7.2. Ligación	50

3.7.3. Transformación de células competentes	50
3.7.4. Selección de colonias recombinantes	51
3.8. Electroforesis de DNA	51
3.8.1. Electroforesis en geles de agarosa	51
3.8.2. Electroforesis en geles de acrilamida	51
3.9. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa	51
3.10. Rastros de la genoteca de <i>D.subobscura</i>	52
3.10.1. Preparación de bacterias para la infección con fago $\lambda$ ( <i>plating</i> bacteria)	52
3.10.2. Plaqueado de las genotecas	52
3.10.3. Aislamiento de clones positivos	52
3.11. Elaboración de mapas de restricción	52
3.12. Obtención de deleciones direccionales	53
3.13. Secuenciación de DNA	53
3.13.1. Preparación de los plásmidos	54
3.13.2. Reacciones de secuenciación	54
3.13.3. Condiciones de electroforesis	54
3.13.4. Fijación, secado y autorradiografía	54
3.14. Análisis de secuencias	54
4. Resultados	55
4.1 Identificación y obtención en <i>D.subobscura</i> de secuencias homólogas al gen <i>zerknüllt</i>	57
4.1.1. Identificación, mediante <i>Southern blot</i> , de secuencias homólogas al gen <i>zerknüllt</i>	57
4.1.2. Rastreo de la genoteca de <i>D.subobscura</i>	57
4.2. Análisis de restricción de los clones del bacteriófago $\lambda$ obtenidos	58
4.3. Determinación de la secuencia del gen <i>zerknüllt</i> de <i>Drosophila subobscura</i>	60
4.4. Análisis comparativo de las secuencias	61
4.4.1. Comparación de las secuencias homólogas al gen <i>zerknüllt</i>	61
4.4.1.1. Organización de la unidad de transcripción	61
4.4.1.2. Secuencia codificante	65
4.4.1.3. Secuencia de aminoácidos	68
4.4.1.4. Región promotora	71
4.4.2. Comparación de las secuencias homólogas al gen <i>bicoid</i>	77
4.4.2.1. Secuencia codificante	77
4.4.2.2. Región 3' no traducida	79
4.5. Análisis conjunto de las secuencias	85
4.6. Análisis del patrón de expresión del RNAm del gen <i>zerknüllt</i>	87
4.7. Búsqueda de secuencias homólogas a <i>z2</i> sobre el DNA genómico	95
4.8. Rastreo con la sonda pgGz2Nde	96
4.9. Paseo cromosómico hacia el gen <i>proboscipedia</i>	99
4.10. Localización del complejo Antennapedia en los cromosomas de <i>D.subobscura</i>	104
5. Discusión	118
5.1. Sobre la comparación de la secuencia proteica de <i>zerknüllt</i>	109
5.1.1. Acerca del grado de conservación de la proteína <i>zen</i>	111
5.1.2. De la distribución y tipo de los cambios de la secuencia	111
5.1.3. Las regiones conservadas, ¿dominios funcionales críticos?	113
5.1.4. Sobre la existencia de secuencias PEST	113
5.2. De la comparación de las secuencias reguladoras de <i>zerknüllt</i>	114
5.3. La región 3' no traducida del gen <i>bicoid</i> , un problema metodológico	117
5.4. De los patrones de expresión, de su análisis y su comparación	118
5.5 El complejo Antennapedia de <i>D.subobscura</i>	120
5.5.1. El gen <i>z2</i> en <i>D.subobscura</i>	120
5.5.2. Estructura y orientación del sbANT-C	123
6. Conclusiones	127
7. Bibliografía	131

## ***1. INTRODUCCIÓN***





"Creced y multiplicaos..."  
(Génesis 1 28)

Esta conocida frase fue escrita hace varios miles de años, cuando la ciencia apenas existía y, desde luego, no había noción alguna (al menos consciente) de lo que era la Genética. Y sin embargo si consideramos este mandato divino (Génesis 1,28) en un sentido amplio (y prescindiendo de cualquier posible significado trascendente) podremos apreciar que en él se mencionan dos de los problemas básicos con los que se enfrenta la genética: el crecimiento, con la diferenciación que implica, y la multiplicación, que supone la transmisión de padres a hijos de los caracteres propios de la especie. Efectivamente, la Genética se ocupó en un principio de resolver las cuestiones relacionadas con la multiplicación, con la reproducción, en un intento de comprender por qué y como se transmite la información de una generación a otra. Se llegaron a descubrir así las leyes de la transmisión de los caracteres hereditarios; se determinaron los mecanismos por los que se producía esta transmisión, se identificó y estudió el material genético en sus distintos niveles de organización, hasta llegar al nivel molecular; se conocieron los principales procesos que controlan la reproducción y expresión de las unidades genéticas y, finalmente, con estos conocimientos se obtuvieron las herramientas necesarias para abordar el problema del crecimiento y la diferenciación.

El propósito de la Genética a este respecto es, ni más ni menos, que descubrir los mecanismos hereditarios que controlan el proceso por el que una célula inicial indiferenciada (el cigoto) es capaz de producir un organismo complejo con estructuras completamente diferenciadas. Aunque actualmente estos estudios se dirigen a todos los seres vivos, los avances más espectaculares se han producido en los sistemas modelo tradicionales. Este es el caso de *Drosophila melanogaster*, cuyo estudio fue uno de los primeros en ser abordado, y sobre cuyo desarrollo existe ya una gran cantidad de información. Los trabajos realizados en la pasada década han podido desentrañar los complejos sistemas genéticos que controlan las primeras etapas del desarrollo de *Drosophila*. Con gran cantidad de datos acumulados en muy poco tiempo, se ha creado un sólido cuerpo de doctrina, que ya se ve reflejado en los libros de texto de Genética y Biología Celular y Molecular (Weaver, 1992; Alberts *et al.*, 1993).

Hoy ya es de conocimiento general que los genes que controlan el desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster* son tanto de expresión materna como cigótica. Estos genes se organizan en distintos sistemas de regulación, que son independientes entre sí. Así, la diferenciación a lo largo del eje anteroposterior (AP) del embrión está controlada por los sistemas anterior y posterior; en el eje dorsoventral (DV) y en los extremos del embrión intervienen, respectivamente, los sistemas dorsoventral y terminal. Las mutaciones de cualquiera de los genes de un sistema no afectan al funcionamiento de los otros, que continúan con su programa independiente mientras el embrión es viable.

El primer sistema estudiado, convertido ya en un paradigma de la Genética del Desarrollo, fue el que dirige la diferenciación de la parte anterior del embrión a lo largo del eje AP. Está ya establecido el



modo en el que la información materna, expresada en forma de gradiente protéico, es interpretada por los genes zigóticos, que actúan en una compleja cascada de interacciones génicas hasta determinar la segmentación de la parte anterior del organismo. El resultado final es la obtención de una serie de unidades metaméricas, los segmentos, que son claramente apreciables en la morfología de las larvas. Sin embargo, las verdaderas unidades genéticas no son los segmentos, sino los parasegmentos, unidades formadas por el compartimento posterior de un segmento y el anterior del siguiente.

Tras la fecundación comienza a sintetizarse la proteína codificada por el gen *bicoid* (*bcd*), que por difusión formará un gradiente de concentración en la parte anterior del embrión. Este gradiente será interpretado por los genes zigóticos de segmentación, cuya finalidad es establecer las bases de la organización metamérica. Los primeros en ser expresados son los genes *gap*, que responden directamente al gradiente *bicoid* y cuyas mutaciones producen la pérdida de grandes regiones del embrión. Los genes *gap* regulan la expresión de los genes de la regla par y de polaridad de segmento, que definen, respectivamente, el número y orientación de los metámeros de la larva. Finalmente, mediante complejas interacciones entre los genes de todos los grupos anteriores se inicia y regula la expresión de los genes homeóticos, que definirán la identidad de cada segmento.

### 1.1. EL COMPLEJO ANTENNAPEDIA

Los genes homeóticos son aquellos cuyas mutaciones producen el cambio de identidad de un segmento, que adopta un destino diferente del que le correspondía. Son genes selectores, capaces de dirigir a la célula hacia un programa determinado de diferenciación. Todos ellos están caracterizados por tener un motivo común de unión al ADN, la *homeobox*, que se ha encontrado en muchas proteínas de unión al ADN.

Los genes homeóticos están agrupados, en *D. melanogaster* en dos complejos génicos: el complejo Antennapedia (ANT-C) y el complejo Bithorax (BX-C). Los genes del complejo Antennapedia intervienen en la diferenciación de la cabeza y parte anterior del tórax (T1 y T2a); los genes del complejo Bithorax lo hacen en el resto del tórax (T2p y T3) y en los segmentos abdominales (A1-A8).

El complejo Antennapedia, que podemos ver en la figura 1 (revisado por Kaufman *et al.*, 1990) tiene una longitud de 300 kb, incluye 8 unidades de transcripción distintas, de tamaños muy diversos, y un *cluster* de genes que codifican proteínas de la cutícula, y contiene grandes regiones intergénicas. Cinco de estos genes son homeóticos: *labial* (Mlodzik Gehring, 1988), *proboscipedia* (Cribbs *et al.*, 1992), *Deformed* (Regulsky *et al.*, 1987), *Sex combs reduced* (Le Motte *et al.*, 1989) y *Antennapedia* (Schneuwly *et al.*, 1986). Tres genes tienen otras funciones en el desarrollo: *bicoid* (Berleth *et al.*, 1988), *fushi-tarazu* (Wakimoto *et al.*, 1984) y *zerknüllt* (Rushlow *et al.*, 1987)). Los restantes genes no tienen relación alguna con el desarrollo: *amalgam* (Seeger *et al.*, 1988) y el grupo de los genes de las cutículas (Pultz *et al.*, 1988)

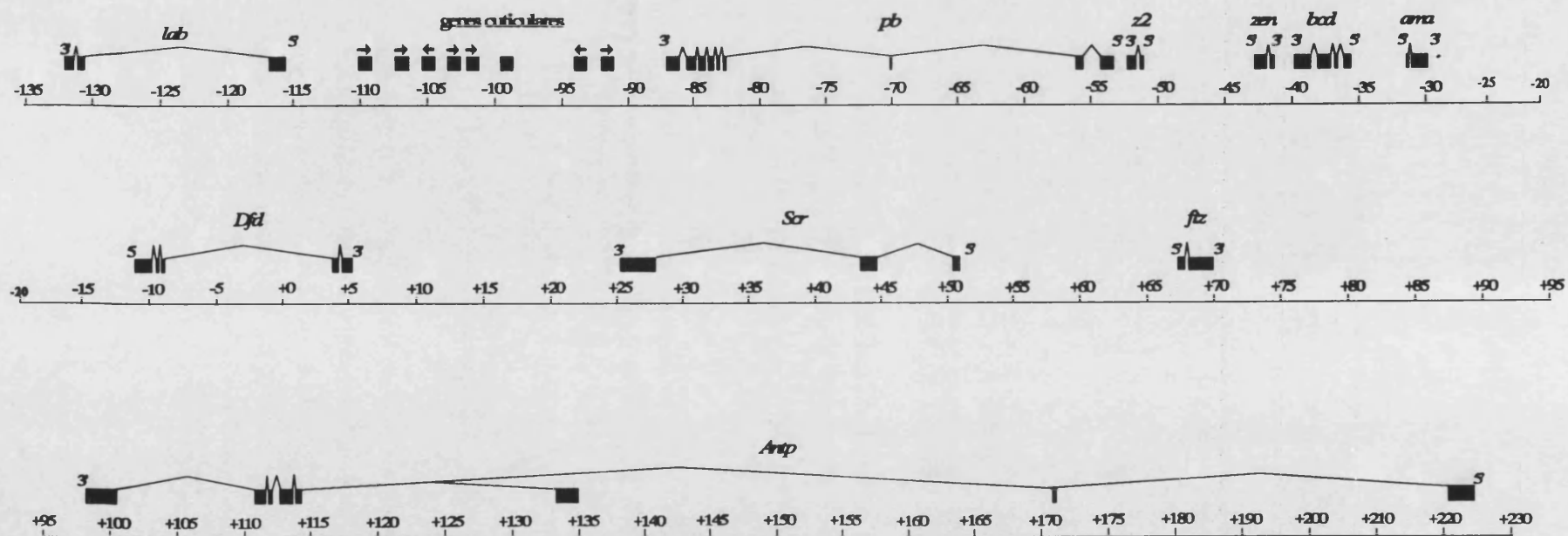
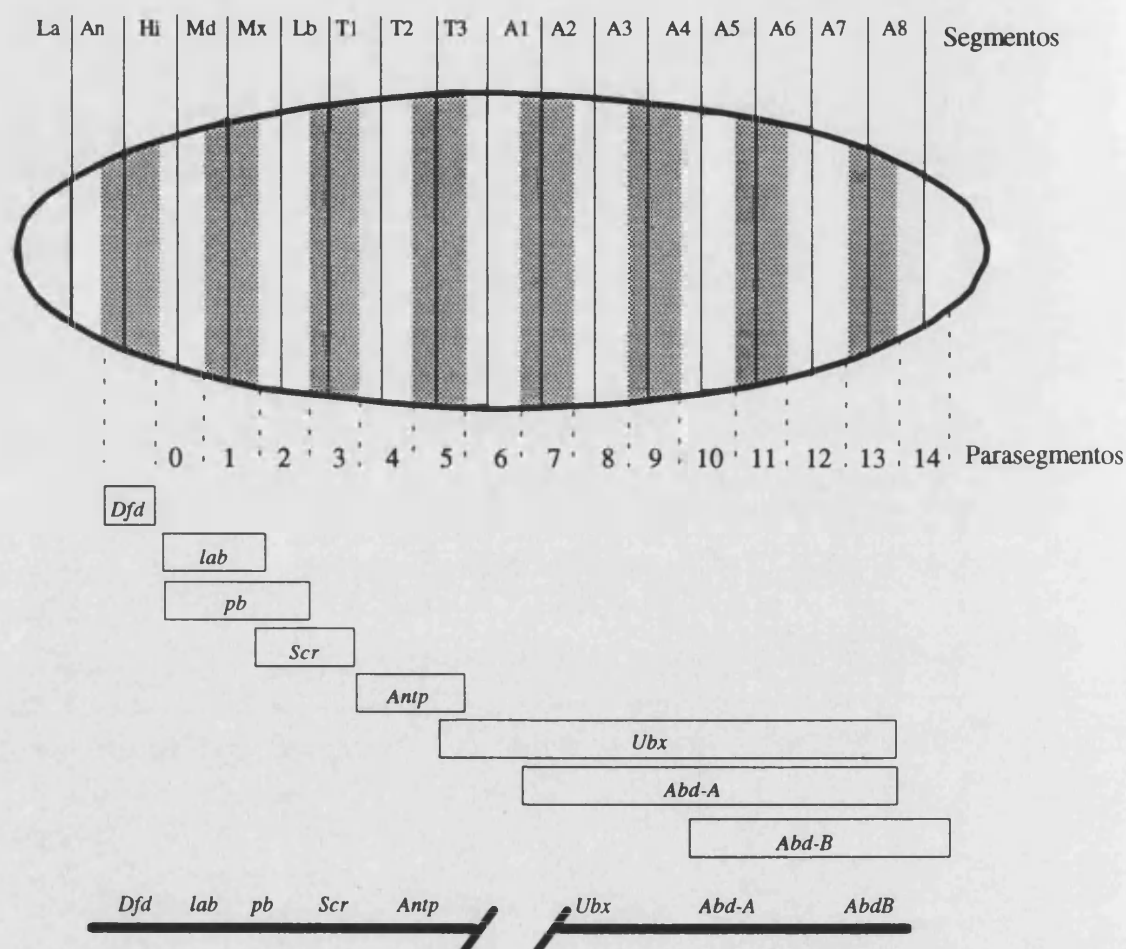


Figura 1. Estructura molecular del complejo Antennapedia de *Drosophila melanogaster*, según el mapa de Scott et al. (1983), Seeger et al. (1988) y Diederich et al. (1989). El complejo, localizado en el cromosoma 3, se ha dividido en tres segmentos, el primero de los cuales es el más próximo al centrómero.



**Figura 2.** Esquema de un embrión de *Drosophila* en el que se representan los segmentos y parasegmentos (La=Labro, An=Antenal, Hi=Hipofaríngeo, Md=Mandibular, Mx=Maxilar, Lb=Labial, T=Torácico y A=Abdominal). En la parte inferior se recogen los principales dominios de expresión de los genes homeóticos, así como su ordenación en el cromosoma (a partir de Morata *et al.*, 1990).

Cada uno de los genes homeóticos de estos complejos tiene un dominio de expresión que (excepto en el caso de *proboscipedia*) coincide con la zona afectada en los mutantes correspondientes. El gen *labial* (*lab*) afecta a la cabeza, en la zona no segmentada del embrión. *Deformed* (*Dfd*) se expresa en los segmentos mandibular y maxilar, que equivalen a los parasegmentos 0 y 1. *Sex combs reduced* (*Scr*) interviene en la formación de los segmentos labial y protorácico, que corresponden a los parasegmentos 2 y 3. El gen *Antennapedia* (*Antp*) es necesario para el desarrollo del mesotórax, metatórax y parcialmente en el protórax (parasegmentos 4 y 5). El caso de *proboscipedia* (*pb*) es singular pues sus mutaciones no producen ningún efecto aparente durante el desarrollo y su dominio de expresión solapa con los de *lab* y *Scr* (revisado por Kaufman *et al.*, 1990).

También debemos mencionar (pues nos hemos de referir a él más tarde) al complejo Bithorax, compuesto por tres genes homeóticos: *Ultrabithorax* (*Ubx*), *Abdominal-A* (*AbdA*) y *Abdominal-B* (*AbdB*). *Ultrabithorax* especifica la diferenciación del metatórax y parte anterior del abdomen mientras que *AbdA* y *AbdB* son los genes que intervienen en la formación de los segmentos abdominales.

La figura 2 es una representación esquemática de una larva, en la que se han indicado las divisiones en segmentos y parasegmentos. En la parte inferior se indican los dominios de expresión de los distintos genes homeóticos de los complejos Antennapedia y Bithorax. Podemos comprobar que cada gen homeótico se expresa en unos determinados parasegmentos, en los que se encarga de determinar su identidad

En esta figura también se ha incluido un esquema de la situación física de los genes en el cromosoma 3. Podemos ver que existe una correlación entre la posición de un gen y su dominio de expresión. Es decir, que el orden de los genes en el cromosoma reproduce el orden en el que éstos se expresan en la larva. Este hecho no es una anécdota de *D. melanogaster* pues, como luego veremos, se ha conservado durante la evolución en todas las especies en las que se estudiado los complejos homólogos a ANT-C y BX-C. La importancia de la estructura también puede verse reflejada en las interacciones que se establecen entre estos genes, que para el complejo Bithorax se sistematizaron en un conjunto de reglas (Lewis, 1978): 1. el estado de represión o desrepresión de un gen está controlado por elementos en cis. 2. los genes tienden a ser desreprimidos de modo individual, 3. un gen desreprimido en un segmento es desreprimido en todos los segmentos posteriores, etc.

## 1.2. LOS COMPLEJOS DE GENES HOMEÓTICOS Y LA EVOLUCIÓN

La extraordinaria conservación evolutiva de la *homeobox* ha permitido la búsqueda de genes homólogos a los de *D. melanogaster* en muchas especies, desde *Caenorhabditis* hasta el hombre, habiéndose encontrado en la mayoría de ellos complejos de genes homeóticos con una organización similar a la de *D. melanogaster*. La conservación es tal que se han podido identificar los homólogos de los diferentes genes del ANT-C y BX-C, comprobándose, con sorpresa, que también se ha preservado el orden de tales homólogos en sus respectivos complejos. Además existen evidencias de que en algunas de estas especies el orden de los genes en el complejo también coincide con el de los dominios de expresión de los mismos a lo largo del eje anteroposterior del embrión (Doboule y Dollé, 1989; Lobe y Gruss,

1990; Boninelli *et al.*, 1989; Dekker *et al.*, 1992; Ross y Tanaka, 1989; Beeman *et al.*, 1993 y Bürglin; Ruvkun, 1993 y Terol *et al.*, 1991).

Entre los primeros genes homeóticos descritos tras los de *D. melanogaster* se hallan los de ratón, en el que han descrito 5 complejos de estos genes, denominados complejos HOX y que están situados en los cromosomas 2, 6, 11 y 15 (v.g.: Doboule y Dollé, 1989; revisado por Lobe y Gruss, 1990). Los genes del complejo HOX2 son equivalentes, uno a uno, a los genes de los complejos Antennapedia y Bithorax de *D. melanogaster*, y se ha comprobado que sus dominios de expresión a lo largo del sistema nervioso central del embrión se correlacionan también con el orden físico en el que se encuentran en el cromosoma (Graham *et al.*, 1989).

También se han encontrado complejos HOX en el hombre. Boncinelli *et al.*, (1989) describen 20 genes en 4 de estos complejos, situados en los cromosomas 2, 7, 12 y 17. En función de la identidad de la secuencia de aminoácidos, se puede alinear la *homeobox* de un *locus* HOX con las de otros *loci* de los restantes complejos, lo que sugiere que éstos podrían haber surgido por duplicaciones de un complejo ancestral. A su vez, se pueden establecer equivalencias entre los genes de estos complejos y los genes homeóticos de *D. melanogaster*. El estudio de la expresión de los genes HOX también revela la relación entre el orden físico de los mismos en el complejo y su expresión sobre el eje AP del embrión.

Otro vertebrado en el que existen complejos de genes homeóticos es *Xenopus laevis*. Dekker *et al.* (1992) han estudiado con detalle la composición y regulación del complejo HOX2 que contiene 6 genes: *Xhox2.9*, *Xhox2.7*, *Xhox1A*, *Xhox1b*, *XIbox2* y *XIbox6*; todos ellos con sus homólogos en *Drosophila* (ver figura 3). Estos genes se expresan con una secuencia espacial que es colineal con su secuencia 3'-5' en el cromosoma; 5 de ellos se expresan muy pronto durante la embriogénesis con una secuencia temporal colineal con la ordenación 3'-5' de los mismos.

La existencia de complejos génicos homeóticos en otros artrópodos ya se sugirió en 1988, cuando se identificó un posible grupo de genes muy conservados ligados en el cromosoma 9 de la cucaracha (*Blattella germanica*), cuyas mutaciones producían alteraciones en la identidad de los segmentos (Ross y Tanaka, 1989). En otros trabajos se han aislado algunos homólogos de los genes homeóticos de *D. melanogaster* en otros insectos, así el equivalente del gen *Abdominal-B* (del complejo Bithorax) ha sido estudiado en el saltamontes (*Schistocerca gregaria*), lo que puede hacer pensar en la existencia de complejos similares a los descritos en la mosca (Kelsh *et al.*, 1993). En el escarabajo *Tribolium castaneum* existe un complejo homeótico, HOM-C, compuesto por 6 genes: *maxillopedia* (*mnp*), *Cephalothorax* (*Cx*), *prothoraxless* (*ptl*), *Ultrathorax* (*Utx*), *Abdominal* (*A*) y *extra urogomphi* (*eu*), que son homólogos, respectivamente, de *pb*, *Scr*, *Antp*, *Ubx*, *Abd-A* y *Abd-B*; también se ha encontrado una relación colineal entre el orden físico de los distintos loci y las regiones del eje AP del embrión que se ven afectadas por sus mutaciones (Beeman *et al.*, 1993).

Finalmente, detallaremos la existencia de un complejo de genes homeóticos en otro de los organismos modelo en genética del desarrollo, *Caenorhabditis elegans*, lo que implica, además, que estos loci también están presentes en los nemátodos, un grupo de animales no segmentados. Este complejo (HOM-C) está formado por, al menos, 5 unidades de transcripción: *ceh-13*, equivalente a *lab*; *lin-39*, que se

corresponde con *Dfd* y *Scr* y que probablemente podría ser el ancestro de ambos; *mab-5* que no es el homólogo directo de ningún gen de *D. melanogaster*, pero que podría ser, en función del alineamiento de las secuencias el gen ancestral del que surgieron *Antp*, *Ubx* y *Abd-A*; *egl-5*, que podría ser el homólogo de *Abd-B* en función de similitudes funcionales y posicionales; por último, *ceh-23* presenta una mayor similitud con el gen *empty spiracles (ems)* de *D. melanogaster*, que no pertenece a ninguno de estos complejos, sin embargo, en el hombre existe un gen parecido, el EMX1, presente en los complejos HOX, lo que indicaría que este gen estaría originalmente en el complejo y se habría perdido en *D. melanogaster* (Bürglin y Ruvkun, 1993). Los genes del HOM-C especifican la identidad posicional a lo largo del eje AP, y tres de ellos lo hacen de manera análoga a sus homólogos en otras especies, cada gen es responsable de una región del cuerpo distinta y, aunque sus dominios solapan, pueden actuar juntos para especificar el destino de las células (Wang *et al.*, 1993).

### 1.3. *D. melanogaster*, UN MODELO QUE NO LO ES TANTO

En la figura 3 se presentan los complejos de genes homeóticos de las especies mencionadas, con los genes homólogos situados a la misma altura. A la vista de la organización de los complejos homeóticos de especies tan diversas podemos llegar a la paradójica conclusión de que ha sido en *D. melanogaster* donde más se ha alterado la organización general. Así, la especie modelo, en la que originalmente se describieron estos genes, presentaría un complejo "partido en dos" y con algunos genes "extraños" adicionales.

En todas las especies estudiadas los genes homeóticos se agrupan en un complejo (del que pueden haber varias copias), mientras que en *D. melanogaster* existen dos complejos situados en dos posiciones diferentes del cromosoma 3, el complejo Antennapedia y el complejo Bithorax. Parece lógico pensar entonces que el complejo ancestral presentaría todos los genes agrupados en un único *cluster* y que, precisamente en *Drosophila*, se produjo la interrupción del mismo por algún tipo de reorganización cromosómica, dando lugar a los ya mencionados ANT-C y BXC.

Además, el complejo Antennapedia habría sufrido otras modificaciones, incorporando genes no homeóticos al mismo, de los que no se han encontrado equivalentes (al menos de un modo evidente) en los complejos de otras especies. Estos genes surgieron probablemente como respuesta a las necesidades planteadas por las peculiaridades del desarrollo de *Drosophila*. El complejo Bithorax estaría, en este aspecto, mejor conservado, pues sólo tiene tres genes homeóticos: *Ubx*, *Abd-A* y *Abd-B*. Los genes no homeóticos del ANT-C son de muy distinta naturaleza y su aparición es difícilmente explicable por una duplicación de los genes existentes previamente. Consideraremos brevemente cada uno de ellos.

El gen *amalgam* (Seeger *et al.*, 1988) y el grupo de la cutícula (Pultz *et al.*, 1988) son los únicos que no están relacionados con el desarrollo de *Drosophila*. El producto del gen *amalgam* está relacionado en los procesos de adhesión celular y no presenta homología de secuencia con ninguno de los restantes miembros del ANT-C. El grupo de genes cuticulares representa uno más de los conjuntos de esta familia de genes que existen en el genoma de *Drosophila*.

Mayor interés, desde el punto de vista evolutivo, podrían tener los genes que, estando implicados en el desarrollo embrionario de *D. melanogaster*, no son genes homeóticos, a pesar de que todos ellos

poseen también la *homeobox*. En este caso se encuentran *bicoid* (*bcd*), *fushi tarazu* (*ftz*), *zerknüllt* y *z2*. El gen *bicoid* ha sido analizado con gran profundidad en todos los aspectos, pues es el morfógeno responsable del establecimiento del eje anteroposterior: Tiene un motivo de unión al ADN de tipo *homeo* y ocupa el 1<sup>er</sup> nivel en la cascada de regulación del sistema anteroposterior (para una revisión sobre el tema ver St. Johnston y Nüsslein-Volhard, 1992). *fushi tarazu* también forma parte del sistema de diferenciación anterior, dentro del grupo de genes de la regla par, y es uno de los genes responsables de la segmentación del embrión. Su patrón de expresión en 7 bandas transversales a lo largo del eje AP refleja, de modo directo, su implicación en la división del embrión en unidades metaméricas.

Por último, *zerknüllt* y *z2* son los genes en los que se va a centrar este trabajo y serán estudiados en profundidad en secciones posteriores. *zerknüllt* es el único gen de desarrollo del complejo Antennapedia que no interviene en la diferenciación del eje anteroposterior, siendo necesario, en cambio, en la determinación dorsoventral y posee también una *homeobox*. El gen *z2* supone un interesante problema evolutivo, pues aunque está relacionado con *zen* por su *homeobox* y presenta un patrón de expresión muy similar a éste, su función permanece desconocida (Rushlow *et al.*, 1987a).

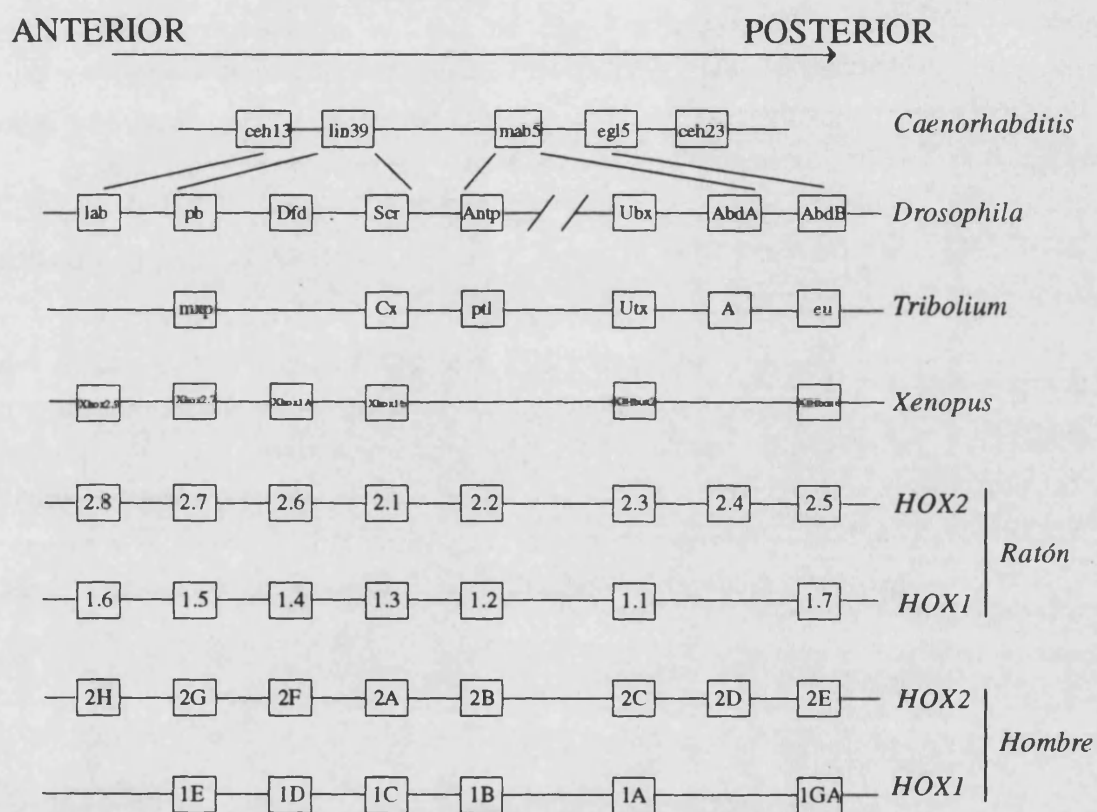
Una vez analizada la organización del complejo Antennapedia de *D.melanogaster*, y comprobadas las diferencias con los complejos de otras especies podemos preguntarnos: ¿Son estas variaciones comunes en todo el género? El análisis del ANT-C en otras especies del género podría ayudar a una mejor comprensión de la evolución de este complejo, aclarando hasta qué punto la rígida organización estructural del mismo es necesaria para el correcto funcionamiento de los genes.

El estudio de algunos de los genes del complejo en otras especies ya ha aportado algunos datos a este respecto: *fushi tarazu*, presente en *D. hydei* con un alto grado de conservación, está invertido respecto a *D.melanogaster* (Maier *et al.*, 1990). Recientemente Randazzo *et al.* (1993) han presentado la estructura completa del complejo Antennapedia de *D. pseudoobscura*. El hecho más reseñable es que la estructura del complejo, en cuanto al orden y la distancia de los genes, está muy conservada. Las únicas diferencias encontradas han sido que el gen *labial* aparece invertido respecto a *D. melanogaster* y que *z2* está ausente en *D. pseudoobscura*. De estos datos podría deducirse que el complejo de genes homeóticos ha sufrido una serie de reordenaciones cromosómicas a lo largo de la historia evolutiva de *Drosophila* que lo han conducido a su estado actual.

Si embargo la gran conservación de la organización del complejo de genes homeóticos encontrada en todas las especies estudiadas apoyaría fuertemente la existencia de un complejo ancestral de genes homeóticos que habría aparecido bien temprano durante la evolución de los metazoos. A medida que los organismos iban adquiriendo mayor complejidad, este complejo homeótico evolucionó para responder a las necesidades del desarrollo; así en el nemátodo *Caenorhabditis* sería suficiente con un complejo de 5 genes, mientras que en el hombre sería necesario un número mucho mayor de genes repartido en varios complejos.

Sin embargo, no deja de ser asombrosa la conservación, no sólo de la secuencia de las *homeobox*, que permite establecer equivalencias entre todos los genes, sino también de la estructura y regulación de estos complejos. El hecho de que se halla mantenido la disposición de estos genes y que, en todos los casos, éstos se expresen en el mismo orden con el que se encuentran en el complejo, sugieren que las

interacciones entre las diferentes unidades de transcripción son fundamentales para su funcionamiento y que estas interacciones están relacionadas directamente con la organización física de estos complejos (Randazzo *et al*, 1993).



**Figura 3.** Comparación de los complejos de genes homeóticos de distintas especies: *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Tribolium castaneum*, ratón y hombre. Los genes homólogos se han situado uno sobre otro, aunque las distancias entre ellos son relativas.



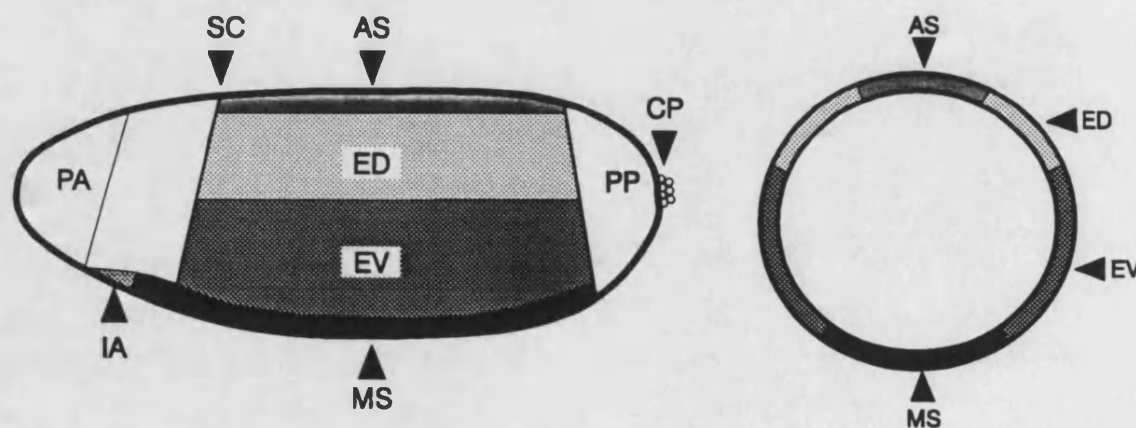
## 2. DETERMINACIÓN DEL EJE DORSOVENTRAL EN *Drosophila*

La diferenciación a lo largo de los ejes anteroposterior y dorsoventral se establece mediante sistemas genéticos que funcionan mediante la interacción de genes maternos y zigóticos y se basan en la formación de un gradiente a lo largo del eje correspondiente. Sin embargo, las reglas que controlan la acción de los genes dorsoventrales son muy distintas a las que controlan la segmentación. Los factores de transcripción y extracelulares (semejantes a factores de crecimiento) son importantes en ambos ejes, pero la forma en que tales moléculas controlan el desarrollo transcurre por caminos muy diferentes. Los genes del sistema anteroposterior fueron los primeros en ser estudiados y las interacciones entre ellos se han sometido a un intenso análisis, por lo que la cantidad (y calidad) de información acumulada es muy grande. En cambio, los estudios del sistema dorsoventral fueron inicialmente menos numerosos, a pesar de que aparentemente debieran ser más sencillos. Esta situación tiende a corregirse y cada vez hay más información sobre las interacciones génicas que dirigen la diferenciación dorsoventral. Hoy podemos disponer de una visión bastante detallada del proceso, aunque quedan todavía grandes lagunas.

### 2.1. EL SISTEMA DORSOVENTRAL DIVIDE AL EMBRIÓN EN TIPOS CELULARES

A diferencia de lo que ocurre con el sistema anteroposterior, en el que la interacción entre genes maternos y zigóticos conduce a la división del animal en un patrón repetido de segmentos, el sistema dorsoventral produce la diferenciación del embrión en varias regiones, en series no reiterativas de tipos celulares. Estos grupos de células darán lugar a los distintos tejidos de la larva.

La polaridad dorsoventral se puede apreciar ya en el huevo de *Drosophila* desde el momento de su puesta: la parte dorsal es más plana, la parte ventral curva y los apéndices coriónicos se sitúan en la parte dorsal. Esta polaridad es el reflejo de la diferenciación de las células de las distintas regiones del eje dorsoventral.



**Figura 4.** División del embrión en los diferentes tipos celulares. AS, amnioserosa, ED, ectodermo ventral, EV, ectodermo ventral, MS, mesodermo, PA, polo anterior, PP, polo posterior, IA, intestino anterior, CP, células polares (Ray *et al.*, 1991).

La circunferencia del embrión, en estado de blastodermo celular, está formada por unas 72 células que se diferencian de la siguiente manera: las 15 o 16 células de la línea media ventral darán lugar a los músculos y otros derivados del mesodermo; 13 blastómeros ventrolaterales en cada lado originarán la epidermis y el nervio ventrales; 12 células dorso laterales de cada lado producirán la epidermis dorsal; y finalmente, las 5 o 6 células de la línea media dorsal, formarán la amnioserosa (Anderson, 1987). En la figura 4 podemos ver una representación de estas divisiones.

El mecanismo por el que se llega a alcanzar la diferenciación celular descrita es el resultado de la interacción entre la información materna, aportada por las células foliculares y nodrizas, y los genes zigóticos que se expresan en cada región. Los mecanismos de regulación incluidos en el proceso son de una gran complejidad y su estudio ha requerido la caracterización, genética y molecular, de muchos genes.

## 2.2. LOS GENES MATERNOS ESTABLECEN UN GRADIENTE DORSOVENTRAL EN EL EMBRIÓN

El patrón de diferenciación dorsoventral del embrión está dirigido por un grupo de 12 genes maternos que se identificaron en las búsquedas de mutaciones que provocaban la esterilidad de las hembras, hasta llegar a la saturación (Anderson y Nüsslein Volhard, 1984, Schüpbach y Wieschaus, 1989). Once de ellos, los recogidos en la tabla I, forman el grupo de genes dorsales, denominado así porque las mutaciones en cualquiera de ellos producen fenotipos *dorsalizantes*, en los que las partes ventrales y laterales del embrión no se diferencian (nervio ventral, epidermis ventral y mesodermo), adoptando las células un destino propio de las regiones dorsales (epidermis dorsal). Una pérdida parcial de actividad en alguno de estos genes produce preferentemente la pérdida de las estructuras más ventrales, expandiéndose las regiones laterales. El gen restante, *cactus* (*cac*), tiene el efecto contrario: la carencia de la actividad materna *cactus* produce la pérdida de la epidermis dorsal, con la consiguiente extensión de las regiones ventrolaterales.

En la tabla I se recogen los resultados obtenidos en experiencias de rescate fenotípico de mutantes, realizadas para cada uno de los genes dorsales (Anderson y Nüsslein-Volhard, 1984): los mutantes *nudel*, *pipe*, *winbeutel* y *gastrulation defective* no pueden ser rescatados mediante ensayos de microinyección, mientras que los demás muestran una recuperación, al menos parcial, del fenotipo salvaje. Esto proporciona un indicio sobre la función de estos genes en la formación del patrón dorsoventral: *dorsal*, *easter*, *pelle*, *snake*, *spätzle*, *Toll* y *tube*, serían necesarios en el interior del oocito y durante el desarrollo embrionario; en cambio los genes *ndl*, *pip*, *wind* y *gd* tendrían su función durante la ovogénesis, por lo que tras la fecundación ya no sería posible el rescate fenotípico. Las combinaciones de dobles mutantes han permitido establecer, además, que *Tl* actúa en niveles posteriores a los de *gastrulation defective*, *nudel*, *pipe*, *snake* y *easter*, pero por encima de *dorsal*, que aparece como el último paso de los genes maternos (Anderson *et al.*, 1985a).

TABLA

LOCUS	RESCATE FENOTÍPICO MEDIANTE MICROINYECCIÓN DE CITOPLASMA
<i>gastrulation defective (gd)</i>	no
<i>dorsal (dl)</i>	si
<i>nudel (ndl)</i>	no
<i>tube (tub)</i>	si
<i>pipe (pip)</i>	no
<i>snake (snk)</i>	si
<i>easter (ea)</i>	si
<i>Toll (Tl)</i>	si
<i>spätzle (spz)</i>	si
<i>pelle (pel)</i>	si
<i>windbeutel (wind)</i>	no

Uno de los primeros genes estudiados fue *snake* (De Lotto y Spierer, 1986) cuyo producto proteico pertenece a la familia de las serin-proteasas y su extremo amino terminal es similar al del factor de coagulación IX, lo que indica que la proteína es sintetizada como un precursor inactivo permitiendo su almacenamiento hasta ser requerida por el embrión. El gen *easter* (Chasan y Anderson, 1989) también codifica para otra serin-proteasa, aunque, al igual que la trombinas, podría actuar como ligando de un receptor de la superficie celular. De Lotto y Spierer sugirieron la existencia de una cascada proteolítica en la regulación de los genes maternos, pero las características de los sitios activos de *snake* y *easter* descartan la idea, pues existe una incompatibilidad de sustratos entre ellos. Ambos genes parecen estar implicados, en cambio, en la activación del producto del gen *Toll*, el siguiente paso de esta cadena.

El gen *Toll* presentaba desde el principio unas características que lo diferenciaban del resto de genes maternos. *Toll* es el único gen, junto con *easter*, que presenta alelos dominantes de ganancia de función; estos alelos producen la ventralización del embrión, perdiéndose las estructuras dorsales (Anderson *et al.*, 1985b). Esto implicaría que la actividad *Toll* no se requiere únicamente para producir la información necesaria en el desarrollo de estructuras ventrales, sino también para la correcta distribución de la información. Por otro lado, en los experimentos de rescate de mutantes mediante la microinyección de citoplasma salvaje, los mutantes *Toll* eran los únicos que presentaban una dependencia de la posición en la que se hacía la microinyección. Mientras que en el resto de genes, independientemente del lugar de la microinyección, se recuperaba el patrón dorsoventral correcto, en los mutantes *Toll* el lugar de la microinyección definía el polo ventral del embrión y la orientación completa

del eje dorsoventral (Anderson *et al.*, 1985b). Entonces, parecía claro que la actividad local del producto de este gen definiría la polaridad del patrón dorsoventral en un embrión normal.

La secuencia de *Toll* predice una estructura similar a las de las proteínas transmembrana, con un dominio fuertemente hidrofóbico entre las regiones citoplásmica y extracelular; el dominio extracelular es similar al de una proteína rica en leucina, la  $\alpha_2$ -glicoproteína del suero humano (Hashimoto *et al.*, 1988). Con estos datos se podría especular que el gen *Toll* codificaría un receptor de membrana, que se situaría en la futura parte ventral, donde, tras unir una señal materna, transmitiría al interior del embrión la información necesaria para la orientación del eje dorsoventral. Sin embargo, trabajos posteriores (Hashimoto *et al.*, 1991), demostraron que la proteína *Toll* se encuentra uniformemente distribuida por toda la membrana plasmática del embrión en estadio sincitial, lo que hacía difícil explicar la respuesta local de los mutantes de este gen.

Todas estas observaciones sugerían que el origen de la asimetría que permite orientar el eje dorsoventral habría de encontrarse en la distribución de la señal que se une al receptor *Toll*. La actividad de los genes *gastrulation defective*, *nudel*, *pipe* y *windbeutel*, que actúan durante la ovogénesis, sería fundamental en este proceso. Las experiencias de trasplante de fluido perivitelino sugieren que el ligando del receptor *Toll* aparece, únicamente, en el espacio perivitelino adyacente a la futura región ventral del embrión y lo hace en muy poca cantidad. De esta manera, solamente los receptores *Tl* de la futura región ventral pueden unir el ligando materno, secuestrándolo del espacio perivitelino e impidiendo que difundiera hacia la región dorsal. La actividad de los genes *nudel*, *pipe* y *windbeutel* sería requerida en este proceso, pues los productos de estos genes, sintetizados en las células foliculares que se encuentran situadas en la parte ventral del ovario, son imprescindibles en el espacio perivitelino. Esta hipótesis explicaría la dependencia de la posición de la microinyección en los experimentos de rescate de los mutantes *Toll*: al no existir en un principio el receptor *Tl*, el ligando materno difundiría por el espacio perivitelino y al microinyectar citoplasma salvaje, o mensajero de *Tl*, el ligando se uniría al receptor allá donde se hubiera inyectado, dando origen a una polaridad errónea. (Stein *et al.*, 1991).

Una vez unido a su ligando la misión de *Tl* será la de transmitir la información posicional al interior del embrión, desencadenando los procesos que, finalmente, llevarán a la activación del morfógeno causante de la polaridad dorsoventral.

### 2.3. EL PATRÓN DORSOVENTRAL ESTÁ DETERMINADO POR UN GRADIENTE DE LOCALIZACIÓN NUCLEAR DE LA PROTEÍNA *dorsal*

Los datos genéticos indicaron, desde un principio, que el gen *dorsal* sería el morfógeno encargado de regular la actividad de los genes zigóticos relacionados con el patrón dorsoventral. Las experiencias de epistasia lo señalaban como el último de los genes maternos en actuar y los mutantes del gen exhibían una acción dependiente fuertemente de la concentración (Roth *et al.*, 1989). *dorsal* fue uno de los primeros genes maternos en ser aislado (Steward *et al.*, 1984) y caracterizado molecularmente

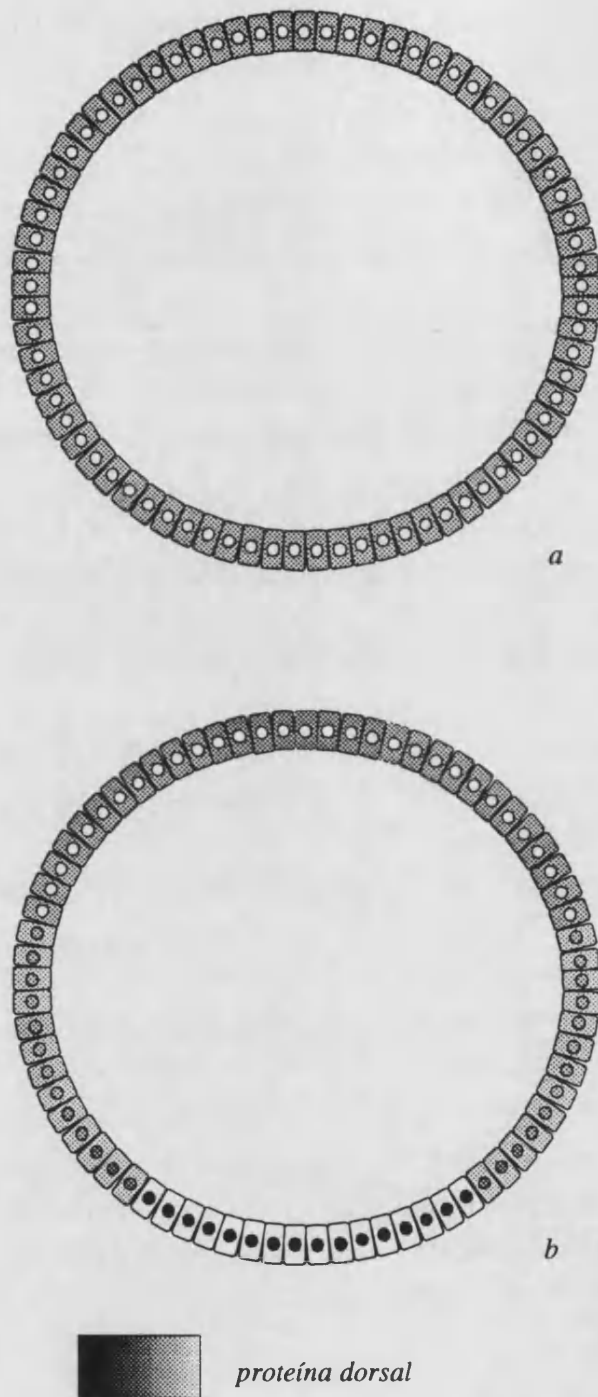
(Steward, 1987), encontrándose una significativa homología con un oncogen nuclear de aves, el *v-rel*, del que se sabía que era capaz de activar la expresión de distintos genes.

*dorsal* se expresa únicamente en las células nodrizas de los ovarios de las hembras adultas, ; el mensajero producido se transporta al oocito, donde es almacenado hasta la puesta del huevo. Steward *et al.*, en 1988, encontraron que este mensajero estaba uniformemente distribuido por todo el embrión por lo que el establecimiento del gradiente dorsoventral quedaba pendiente de procesos postranscripcionales o postraduccionales. En ese mismo trabajo y en otro posterior (Roth *et al.*, 1989) se demostró la existencia de un gradiente proteico de localización nuclear, según el cual, la proteína *dl* era intranuclear en la región ventral y citoplasmática en la región dorsal.

El mensajero de *dorsal* comienza a ser traducido 90 minutos después de la fecundación e inicialmente la proteína está uniformemente distribuida por todo el embrión. En el ciclo celular número 11 ya comienza a detectarse proteína *dl* en los núcleos de la región ventral y el proceso continúa hasta que en el ciclo 14 la proteína está restringida a los núcleos en la parte ventral y es exclusivamente citoplasmática en la zona dorsal (Figura 5). Mediante experiencias en cultivos de tejido de *Drosophila* se ha demostrado que el transporte de la proteína *dl* desde el citoplasma al núcleo se realiza de manera activa (Rushlow *et al.*, 1989). Como resultado de este transporte hacia el núcleo se producen 3 dominios de expresión a lo largo del eje DV: un dominio ventral con los máximos niveles nucleares de proteína, que corresponde al futuro mesodermo; una zona lateral de transición, que será la región neurogénica y, por último, un dominio dorsolateral, en el que no hay expresión nuclear de *dl* y dará lugar a las estructuras dorsales. En el inicio del transporte diferencial de la proteína *dl* al interior del núcleo intervienen los genes maternos *cactus*, *spätzle*, *tube* y *pelle*.

De los 12 genes de efecto materno que codifican componentes del proceso de formación del patrón dorsoventral, *cactus* es el único cuyas mutaciones de pérdida de función producen fenotipos ventralizados. Esta ventralización está causada por un incremento de los niveles nucleares de la proteína *dl* en todo el embrión, lo que sugiere que *cac* puede actuar como un regulador negativo de la localización nuclear de esta proteína (Roth *et al.*, 1989). Los estudios de epistasia indican que este gen sólo actúa vía *dorsal* y no es un morfógeno independiente, pues el fenotipo dorsalizado de los mutantes *dl* no se altera con la pérdida de función de *cac* (Roth *et al.*, 1991).

La unión de la proteína *cac* al producto de *dl* impediría su transporte hasta el núcleo, con lo que *dorsal*, que actúa interaccionando con el ADN, no podría realizar su función reguladora. Este modelo se plantea por homología con el sistema NF- $\kappa$ B/I- $\kappa$ B, pues el gen *dorsal* pertenece a la familia de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B (a la que también pertenece *v-rel*). En este sistema es necesario que se produzca la disociación del factor I- $\kappa$ B para que NF- $\kappa$ B pueda ser transportada al núcleo. La disociación de I- $\kappa$ B se produce por una modificación de esta proteína, que es fosforilada por una protein-quinasa en respuesta a una serie de señales extracelulares.



**Figura 5.** Sección de un embrión de *Drosophila* en el que se muestra la fase inicial de la distribución de la proteína dorsal (a) y en el ciclo 14, cuando ya se ha completado el gradiente nuclear (b).

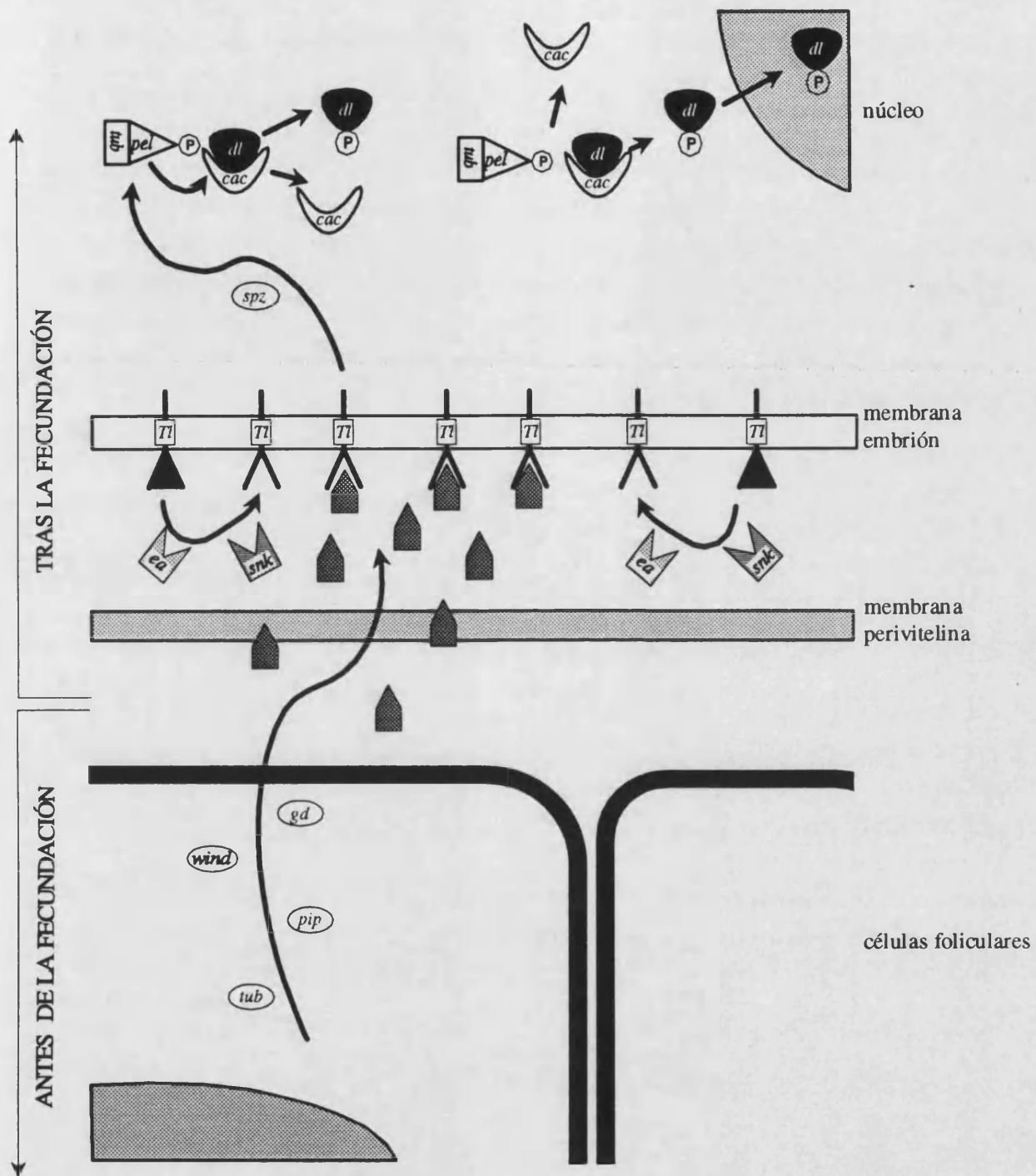
En el caso de *Drosophila* y el patrón de diferenciación dorsoventral el modelo planteado sería similar aunque la modificación producida como respuesta a la actividad *Toll* afectaría a la proteína *dorsal*, que ha de ser fosforilada para que se inicie su transporte al núcleo (Norris y Manley, 1992). Al unir el ligando materno, *Toll* desencadenaría una cascada de interacciones, cuyo último paso sería la fosforilación de *dorsal* por una protein-quinasa, que se separaría entonces de *cactus*. El dominio intracelular de *Toll* tiene cierta similitud con la secuencia del receptor IL-1, que es un regulador positivo de la función NF- $\kappa$ B. (Gay y Keith, 1991). Las similitudes entre los 2 sistemas son evidentes, aunque todavía quedaría por establecer cómo transmiten estas proteínas la información al interior de la célula.

Los genes *spätzle*, *pelle* y *tube* son firmes candidatos a formar parte de la ruta de transducción activada por *Toll*. Los análisis de epistasia han mostrado que estos genes funcionan en niveles posteriores a *Toll*, aunque por encima de *dorsal* y en paralelo con *cactus*.

El gen *pelle* parece, *a priori*, el más interesante pues codifica una proteína con un dominio catalítico del tipo protein-quinasa, que le permitiría regular, mediante fosforilación, la actividad de otras proteínas (Shelton y Wasserman, 1993). El gen *tube* contiene 5 copias de un motivo de 8 residuos sin homología significativa con ninguna proteína conocida, por lo que *tube* representaría una nueva clase de proteínas con actividad en la transducción de señales durante el desarrollo (Letsou *et al.*, 1991, 1993), que podría ser la de facilitar la activación de *pelle* o la interacción de éste con sus sustratos (Shaton y Wasserman, 1983).

Una vez descritos todos los genes maternos implicados en la formación del sistema dorsoventral podemos tener una visión general del proceso que, en última instancia, conduce a la formación de un gradiente de localización nuclear de la proteína *dorsal* (Figura 6.):

Durante la ovogénesis la actividad de los genes *gastrulation defective*, *pipe*, *nudel* y *windbeutel* en las células foliculares daría lugar a la formación de una molécula señal, que llegaría al espacio perivitelino después de la fecundación. Esta señal sería rápidamente secuestrada por el receptor *Toll*, previamente activado por las protein-quinasas *easter* y *snake*. La proteína *Toll* desencadenaría una ruta de transducción en el interior del embrión, cuyo último paso sería la fosforilación de *dorsal* por *pelle*, en esta ruta intervendrían *tube* y *spätzle*. Una vez modificada, la proteína *dorsal* se disociaría de *cactus*, a la que estaba unida. Producida la disociación de estas proteínas, podría comenzar el transporte activo de *dorsal* hacia el interior del núcleo únicamente en la región ventral del embrión, creándose un gradiente de localización nuclear. Finalmente, en el interior del núcleo, *dorsal* podría ejercer su actividad reguladora de los genes zigóticos, activando o reprimiendo su transcripción.

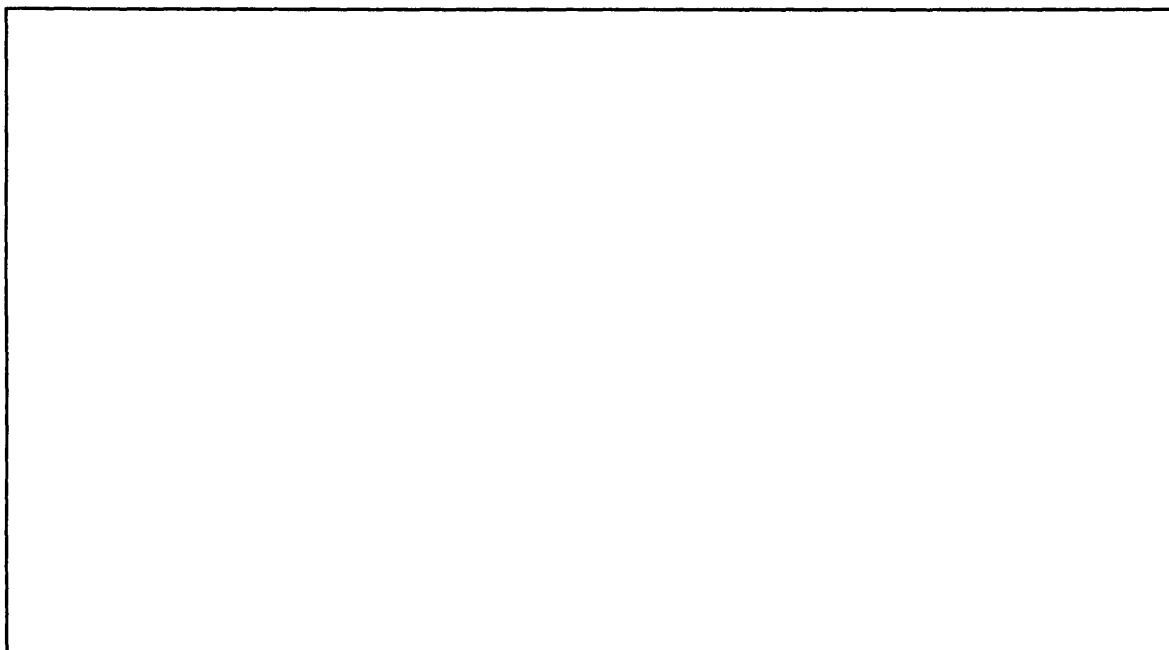


**Figura 6.** Esquema general de la cascada de regulación de los genes maternos del sistema dorsoventral. Para comentarios ver el texto. Este esquema refleja las funciones hipotéticas de los genes implicados, por lo que la posición propuesta para alguno de estos genes podría no ser la definitiva.



## 2.4. LOS GENES ZIGÓTICOS CONTROLAN LA DIFERENCIACIÓN DORSOVENTRAL

Las experiencias de mutagénesis han permitido identificar los genes zigóticos relacionados con la diferenciación dorsoventral, que responden a la regulación del gen *dorsal*. En general, estos loci afectan a las regiones que se diferencian a lo largo del eje DV: amnioserosa, ectodermo dorsal, ectodermo ventral y mesodermo. Como hemos visto anteriormente, el morfógeno *dorsal* establece 3 dominios a lo largo del eje DV en función de su localización nuclear; el dominio ventral tendría la máxima concentración nuclear de la proteína *dl*; el dominio lateral presentaría unos niveles intermedios de la misma y el dominio dorsal se caracterizaría por la ausencia de *dl* en los núcleos. Los genes zigóticos dorsoventrales responden de modo diferente a estos niveles de *dl*, produciéndose la activación o represión de los mismos.



**Figura 7.** (a) Sección transversal de un embrión de *Drosophila* en el que se muestra el gradiente *dorsal*. (b) Una sección equivalente con la expresión de algunos genes zigóticos regulados por *dorsal*. *dpp*= *decapentaplegic*, *zen*= *zerknüllt*, *twi*= *twist*.

Dos de estos genes, *twist* (*twi*) y *snail* (*sna*), requieren elevados niveles nucleares de *dorsal* para su activación, por lo que sólo se expresan en el dominio ventral. Ambos genes son responsables de la diferenciación del mesodermo y sus mutaciones producen embriones dorsalizados, sin estructuras ventrales. Los otros 6 genes se expresan en la parte dorsal del embrión, son reprimidos por *dorsal*, por lo que quedan restringidos a las zonas donde la concentración nuclear de ésta proteína es baja o nula. Las mutaciones de los genes *decapentaplegic* (*dpp*), *tolloid* (*tld*), *screw* (*scw*), *shrew* (*srw*), *zerknüllt* (*zen*) y *twisted gastrulation* (*tsg*) ocasionan la pérdida total o parcial de las estructuras dorsales, produciéndose embriones ventralizados. Existe un séptimo gen, que aunque se expresa en células ventrales sus efectos fenotípicos se muestran en la región dorsal, éste es *short gastrulation* (*sog*) (Ferguson y Anderson, 1981).

Además de los genes que hemos mencionado, en la región dorsolateral se expresa un grupo de genes que es crucial para la neurogénesis, pues tanto el sistema nervioso central como el periférico surgen del ectodermo ventral, también llamado neuroectodermo. Estos loci son *rhomboid* (*rho*), *Star* (*S*), *spitz* (*spi*) y *pointed* (*pnt*) (Mayer y Nüsslein-Volhard, 1987). De estos genes, *rho* es el mejor caracterizado: codifica para una proteína de tipo transmembrana y su función es necesaria para el desarrollo del número correcto de órganos cordotonaes (Bier *et al.*, 1990); está regulado por *dorsal*, que actúa junto a proteínas HLH para activarlo, y *snail*, que lo reprime en la región ventral (Ip *et al.*, 1992a).

## 2.5. *twist* Y *snail* REGULAN LA FORMACIÓN DEL MESODERMO

En *Drosophila*, la gastrulación comienza cuando las células de la línea media ventral se invaginan, formando el surco ventral. Las células implicadas en este proceso son las precursoras del intestino anterior y medio (endodermo), del mesodermo y del proctodeo. Los primordios derivados de esos precursores darán lugar a la mayoría de los órganos internos de la larva (Campos Ortega y Hartenstein, 1985).

El gen *twist* se expresa específicamente en las células del blastodermo celular situadas ventralmente y que, pocos minutos después, se invaginarán para dar lugar al surco ventral de la gástrula temprana; más tarde, los transcritos se localizan en el futuro mesodermo del embrión (Thisse *et al.*, 1987). En los mutantes *twist* se produce la dorsalización parcial del embrión: el surco ventral no se forma y el mesodermo no se diferencia, faltando todos los órganos internos; esta mutación es letal en homocigosis (Nüsslein-Volhard *et al.*, 1984). El gen *dorsal* es necesario para la expresión de *twist*: en los mutantes *dl* el gen *twist* no se expresa y las células ventrales no se diferencian como mesodermo (Thisse *et al.*, 1987). En el promotor de *twist* se han identificado las secuencias específicas a las que se une *dorsal*, encontrándose hasta 5 copias del motivo de unión de esta proteína (Pan *et al.*, 1991). También se ha encontrado un proceso de autorregulación, por el que la proteína *twist* sería un regulador positivo de su propia transcripción (Ray *et al.*, 1991). El gen *twist* codifica para una proteína que pertenece a la familia de las proteínas de unión al ADN con el motivo hélice-lazo-hélice (HLH, del inglés *helix-loop-helix*) que tiene localización nuclear (Thisse *et al.*, 1988). La función de *twist* sería la de activar a los genes que han de expresarse en el mesodermo, como es el caso de *tinman*, que está regulado positivamente por *twi* (Bodmer *et al.*, 1990) y es necesario para la formación del corazón y las vísceras (Bodmer, 1993).

Los mutantes del gen *snail* producen, en su expresión más extrema, el desarrollo anormal del ectodermo lateral y la ausencia del mesodermo, mientras que los alelos más débiles solo afectan a las estructuras más ventrales. Inicialmente *sna* se expresa en el mesodermo, en las células del surco ventral que luego se invaginan, en una segunda fase aparece en los precursores de los sistemas nerviosos central y periférico. El producto *sna* pertenece a la familia de proteínas de unión al ADN mediante el motivo de dedos de zinc (Boulay *et al.*, 1987) y presenta una localización nuclear (Alberga *et al.*, 1991) lo que sugiere que su actividad sería la de regular a otros genes; esto se ha confirmado con el trabajo de Kasai *et al.* (1992), que describe la actividad represora de *snail* sobre el gen neurogénico *single minded*, que interviene en la diferenciación de las células sensoriales. *dl* y *twi* participan en la activación de *sna*: su

expresión no se inicia en los mutantes *dl* y hay una fuerte reducción en los niveles de la misma en los mutantes *twi* (Jiang *et al.*, 1991, Ray *et al.*, 1991). *dl* y *twi* activan directamente la expresión de *snail*, ambas proteínas funcionan cooperativamente para asegurar una expresión intensa y uniforme de este gen. La interacción de *dl* y *twi*, explicaría la existencia de unos límites definidos en la expresión de *snail*, pues la acción única del gradiente *dl* favorecería la formación de límites difusos, como ocurre en la expresión de *twi* (Ip *et al.*, 1992b).

Aunque *twist* y *snail* están implicados en la formación del mesodermo, actuando como genes reguladores, su función en el proceso no es la misma. Los fenotipos de sus mutaciones ya muestran que mientras *twist* solo afecta a la formación del mesodermo, *snail* también afecta la del ectodermo ventral. En general, *twist* sería requerido para la activación de genes mesodérmicos mientras que *snail* impediría la expresión en el mesodermo de genes destinados a ser activos en regiones más laterales o dorsales (Leptin, 1991).

## 2.6. *decapentaplegic* ACTÚA COMO UN MORFÓGENO EN LA REGIÓN DORSAL

Las mutaciones nulas del gen *decapentaplegic* provocan los fenotipos ventralizantes más severos de todos los genes zigóticos que se expresan en la región dorsal. Estos embriones no completan la extensión de la banda germinal y producen larvas del primer estadio en las que no es detectable ninguna estructura derivada de la epidermis dorsal, apareciendo, en su lugar, una cutícula típica del ectodermo ventral (Irish y Gelbart, 1987). De acuerdo con su función en el desarrollo temprano, *dpp* se expresa inicialmente en la región dorsal de los embriones en estadio de blastodermo sincitial, abarcando aproximadamente el 40% de la circunferencia del embrión, lo que incluye el ectodermo dorsal y la amnioserosa; a continuación se produce la modulación de esta expresión, quedando limitada al futuro ectodermo dorsal (St. Johnston y Gelbart, 1987). La posterior expresión de *dpp* en el ectodermo lateral y dorsal, en el mesodermo visceral y en los discos imaginales indican que *dpp* es necesario en otras funciones del desarrollo embrionario y larvario (Panagiban *et al.*, 1990, Reuter *et al.*, 1990 y Masucci *et al.*, 1990).

*dpp* es necesario para la expresión de los restantes genes zigóticos de la región dorsal, pues en su ausencia estos genes comienzan a expresarse pero su actividad se pierde inmediatamente (Ray *et al.*, 1991). Este gen codifica un polipéptido relacionado con una familia de factores extracelulares que incluye el factor crecimiento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Los miembros de esta familia participan en muchos procesos del desarrollo y actúan como señales extracelulares que activan a los receptores específicos de sus células diana (Padgett *et al.*, 1987).

La diversidad de funciones de *dpp* en diferentes tejidos y tiempos durante el desarrollo, se ve reflejada en la compleja organización genética del locus. Se han definido 3 regiones en el gen, en función de criterios genéticos, *shortvein* (*shv*), *haploinsufficiency* (*Hin*) e *imaginal disk* (*disk*), cuyas funciones se han estudiado en detalle: Segal y Gelbart, 1985, Irish y Gelbart, 1987 y Hoffman y Goodman, 1987.

Esta complejidad genética responde a una complicada estructura molecular y una elaborada regulación de la expresión. La unidad de transcripción de este gen es de unas 55 kb, con una región

reguladora en la zona 3' de, al menos, 25 kb; se han detectado 5 transcritos diferentes, que responden a sus respectivos promotores, aunque los 5 poseen 2 exones comunes, que pertenecen a la región Hin, y son los que presentan la homología con los factores TGF- $\beta$  (St. Johnston *et al.*, 1990). La expresión dorsoventral de *dpp* está regulada por múltiples elementos situados en cis en el segundo intrón. En este intrón se encuentran los elementos responsables de activación general y la represión ventral del gen. Esta última está controlada directamente por el gen *dorsal*, pues existen múltiples sitios de unión de baja afinidad para la proteína *dl*, cuya acción conjunta consigue una represión ventral total (Huang *et al.*, 1993).

Los experimentos realizados con diferentes dosis de *dpp* indican que éste podría actuar como un morfógeno de la región dorsal del embrión, aunque la distribución inicial de su mensajero sea uniforme. Solo niveles bajos de *dpp* permiten el desarrollo del ectodermo ventral, los valores intermedios conducen a la formación del ectodermo dorsal y valores muy elevados producen la diferenciación de la estructura más dorsal, la amnioserosa (Ferguson y Anderson, 1992).

## 2.7. *tolloid* y *shrew* CONTRIBUYEN A LA FORMACIÓN DEL GRADIENTE *dpp*

En la formación del gradiente *dpp* intervienen 2 genes zigóticos, *tolloid* y *shrew*, cuya misión es la de modular la actividad de este gen (Ferguson y Anderson, 1992b). *tolloid* y *shrew* actuarían incrementando la actividad de *dpp* en la región dorsal del embrión; una dosis doble de *dpp* es capaz de suprimir, parcialmente, el fenotipo causado por mutaciones nulas de ambos genes por lo que ambos deben actuar en un nivel anterior al de *dpp*.

La secuencia de *tolloid* (Shimell *et al.*, 1991) indica que el producto de este gen podría elevar la actividad *dpp* mediante procesos postraduccionales. El producto sintetizado por *tolloid* presenta homología con una proteína de la morfogénesis de los huesos, BMP-1, que fue aislada de un complejo génico que puede inducir ectópicamente la formación de tejido óseo. Curiosamente, las restantes proteínas del complejo pertenecen a la familia TGF- $\beta$  y algunas de ellas son idénticas al extremo carboxiterminal de *dpp*. Estas homologías sugieren que *dpp* y *tolloid* podrían estar físicamente asociadas.

En contraste con la actividad de los anteriores genes, *short gastrulation* llevaría a cabo una regulación negativa de *dpp*. La elevación de los niveles de *dpp* en mutantes *sog*, produce alteraciones en el desarrollo del neuroectodermo, por lo que parece que *sog* tendría como misión inhibir la actividad *dpp* en las regiones ventrales. El producto *sog* actuaría sobre la proteína *dpp*, impidiendo su acción, en los mutantes *sog* se produciría una difusión de *dpp* al neuroectodermo, donde produciría una dorsalización del mismo (Ferguson y Anderson, 1991).

### 3. EL GEN *zerknüllt*

Muchos de los genes que especifican la información posicional en *Drosophila* están relacionados evolutivamente y poseen la *homeobox*, una secuencia de 180 pb que es un motivo de unión al ADN. La mayoría de genes con *homeobox* descritos en *Drosophila* controlan la morfogénesis de los elementos del eje anteroposterior, y las mutaciones de esos genes afectan al patrón normal de segmentación. En contraste, el gen *zerknüllt* (*zen*) es singular entre estos genes de *Drosophila*, puesto que su función se requiere en la diferenciación dorsoventral y no está implicado en la determinación del eje anteroposterior.

Los mutantes del gen *zerknüllt* fueron aislados en las experiencias de saturación del complejo *Antennapedia* realizadas por Wakimoto *et al.* en 1984. Estos mutantes muestran un complejo fenotipo en estadios avanzados del desarrollo, que es el producto de una extensión de la banda germinal y una involución cefálica defectuosas. El análisis de mutantes en períodos más tempranos del desarrollo indican la ausencia del lóbulo óptico y de la amnioserosa, que derivan de las regiones más dorsales del mapa de destinos del embrión. La ausencia de la amnioserosa impide la extensión de la banda germinal, causando el característico retorcimiento de la misma. Podemos deducir, entonces, que el papel de la amnioserosa es crucial el proceso de extensión de la banda germinal (Rushlow y Levine, 1990).r

#### 3.1. LA AMNIOSEROSA

Los primordios de la amnioserosa, o membrana extraembrionaria, aparecen durante el estadio 7 de la embriogénesis de *Drosophila*. En la fase inicial, y más rápida, de la extensión de la banda germinal (estadio 8) se produce un desplazamiento de los pliegues dorsales, acompañado de modificaciones en los componentes celulares, cuya forma cambia de columnar a extremadamente aplanada. Estos cambios de forma preceden a la aparición de la amnioserosa, que está formada por unas doscientas células derivadas de la banda de células mediodorsales del blastodermo. La amnioserosa permanecerá en esa posición, a lo largo de los flancos del embrión, durante el período completo de extensión de la banda germinal.

Durante el retraimiento de la banda germinal, en el estadio 12, la membrana extraembrionaria se expandirá para formar la cubierta dorsal del embrión. En el estadio 13, tras el completo retraimiento de la banda germinal, la pared dorsal del embrión está formada por la amnioserosa, cuyas células, al principio de este estadio, aún muestran su característico aspecto (extremadamente plano y delgado). Sin embargo, ya durante este estadio, la capa epidérmica de ambos lados comienza a crecer dorsalmente sobre la amnioserosa hacia la línea media dorsal. El cierre dorsal de la epidermis concluye hacia el final del estadio 15 y las células de la amnioserosa cubiertas por la epidermis se agrandan considerablemente se redondean y pierden sus anclajes. Las evidencias histológicas sugerían que las células de la amniosersa se incorporaban al vaso dorsal, dando lugar a las células pericárdicas; sin embargo, en un análisis de la embriogénesis realizado mediante líneas de *enhancer trap*, indica que esta asociación es sólo temporal, y que, después del estadio 16, las células de la amnioserosa migran a la hemolinfa, donde

probablemente degeneran (Hartenstein y Jan, 1992). Hay que destacar que, durante todo este proceso, las células de la membrana extraembrionaria nunca se dividen (Campos y Ortega y Hartenstein, 1985).

### 3.2. LAS MUTACIONES *zen* CAUSAN LA PÉRDIDA DE LA AMNIOSEROSA

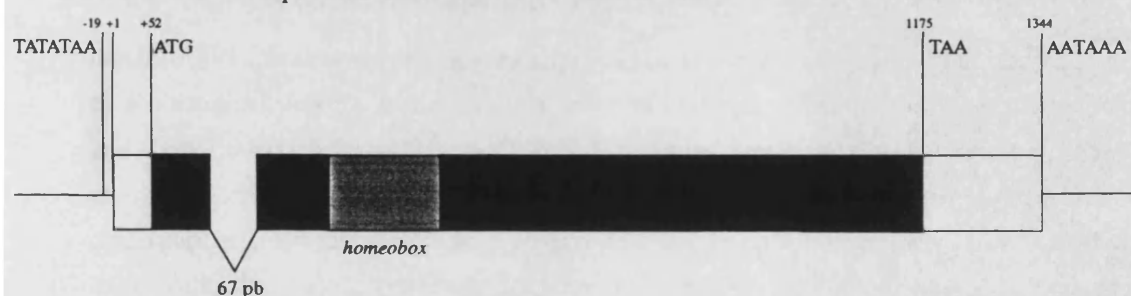
El período crítico de los mutantes *zen* sensibles a la temperatura se extiende de 2 a 4 horas después de la fertilización, por lo que el complejo fenotipo presente en los estadios avanzados se ha de explicar sobre la base de que el defecto primario ocurre durante el desarrollo temprano. Los efectos de las mutaciones de *zen* suponen una ventralización de la parte más dorsal del embrión, afectando a la formación de la amnioserosa principalmente. La ausencia de la membrana extraembrionaria será la causa de que se produzcan anomalías en la formación del surco cefálico y en la extensión de la banda germinal. Especialmente se produce un retorcimiento de la banda germinal, que sufre numerosos pliegues y es incapaz de terminar su proceso de elongación (Rushlow y Levine, 1990).

Estos fenotipos, con gastrulaciones defectivas, son similares a los que producen las mutaciones dominantes del gen materno *Toll* (Anderson y Nüsslein-Volhard, 1984b), lo que sirvió en su momento para identificar al gen *zerknüllt* como un miembro del sistema de determinación dorsoventral. En ninguno de los mutantes analizados se producen alteraciones en el patrón anteroposterior, en todos ellos hay un número correcto de segmentos y el patrón cuticular asociado a cada segmento aparece como normal.

### 3.3. ESTRUCTURA MOLECULAR DEL GEN *zerknüllt*

El gen *zerknüllt* se aisló en una búsqueda de nuevos genes homeóticos en la que se usó la *homeobox* del gen *Sex combs reduced* como sonda. Uno de los ADNc obtenidos provenía de la región *zen* del complejo Antennapedia (ANT-C), con lo que el nuevo gen fue identificado (Doyle *et al.*, 1986).

La estructura molecular del gen *zerknüllt* ha sido determinada por Rushlow *et al.* (1987a). *zen* codifica un único mensajero de 1300 pb, que puede ser detectado en la embriogénesis temprana y presenta un máximo de expresión entre las 2 y 3 horas después de la fertilización. Este mensajero contiene una pauta de lectura de 1059 pares de bases, que predice una proteína de 353 aminoácidos y 39 KD. El gen posee una *homeobox* situada hacia el extremo amino terminal de la proteína y pertenece a la familia *Antennapedia* de estos motivo de unión al ADN.



**Figura 8.** Estructura molecular del gen *zerknüllt* de *Drosophila melanogaster*. Se muestra en negro la secuencia codificante, en blanco la secuencia no traducida. Se ha señalado la caja TATA (en -19), el punto de inicio de la transcripción(+1), el inicio de la secuencia codificante (ATG en +52), la longitud

del intrón (67 pb), la *homeobox*, el codón de parada (TAA en +1175) y la señal de poliadenilación (AATAAA en +1344). Según Rushlow *et al.*, 1987a.

La organización genómica del gen es bien conocida: existe un pequeño intrón (64 nucleótidos) cerca del extremo 3', el primer codón (AUG) está situado a 52 pb del punto de inicio de la transcripción y la señal de poliadenilación se halla a 169 pb del codón de parada (TAA). La región promotora se extiende 1600 pb en dirección 5' desde el punto +1, lo que se ha averiguado mediante experiencias de transformación, en las que se intentaba rescatar la mutación *zen* provocada por una delección del gen. Para que el rescate fenotípico fuera completo era necesaria una región de 1600 pb adyacente al extremo 5', en la que se sitúan las secuencias reguladoras de la expresión del gen (Rushlow *et al.*, 1987a). El hecho de que el gen *zerknüllt* posea la *homeobox* indica que puede actuar como un regulador de la transcripción, aunque no se conoce ni el número ni la naturaleza de sus genes subordinados. Podría ocurrir que el producto *zen* activara directamente a los genes responsables de la diferenciación celular, pero también podría actuar sobre unos pocos genes reguladores, que continuarían la cascada de regulación.

Los pocos datos que se conocen sobre la actividad del gen se han obtenido en experiencias de expresión transitoria en cultivos de tejido. La proteína *zen* muestra una alta afinidad por la secuencia TCAATTAAAT y es capaz de activar fuertemente la transcripción de promotores heterólogos que contengan un gran número de copias de ese consenso. Esta activación depende de la *homeobox*, así como de una secuencia distal situada en el extremo carboxi-terminal de la proteína. Este último dominio incluye una serie de serinas y treoninas que podrían adquirir carga negativa mediante fosforilación. De esta manera, la proteína *zen* sería similar a los activadores transcripcionales de levadura GAL4 y GCN4, que tienen los dominios de activación y de unión al ADN separados (Han *et al.*, 1989).

La proteína presenta, en algunos puntos, secuencias similares a los motivos PEST, que están presentes en los polipéptidos de vida breve, lo que estaría de acuerdo con su corto período de actuación durante el desarrollo, pues a las 6 horas del a fecundación ya no se detecta producto *zen* (Rushlow y Levine, 1990).

### 3.4. LA EXPRESIÓN DE *zen* ESTÁ RESTRINGIDA A LA REGIÓN DORSAL

El patrón de expresión del gen se ha descrito tanto para el mensajero (Rushlow *et al.*, 1987a) como para la proteína (Rushlow *et al.*, 1987b). Los transcritos de *zen* tienen una amplia distribución a lo largo de la región dorsal de los embriones precelulares, incluyendo los polos anterior y posterior. En una sección del embrión esta expresión inicial abarca el 40% de la circunferencia del embrión. Durante la gastrulación, la expresión del gen se modula, quedando restringida a las células más dorsales, que darán lugar a la amnioserosa y al lóbulo óptico (10% de la circunferencia del embrión). Los transcritos dejan de apreciarse a las 6 horas de la fertilización, coincidiendo con el final de la extensión de la banda germinal.

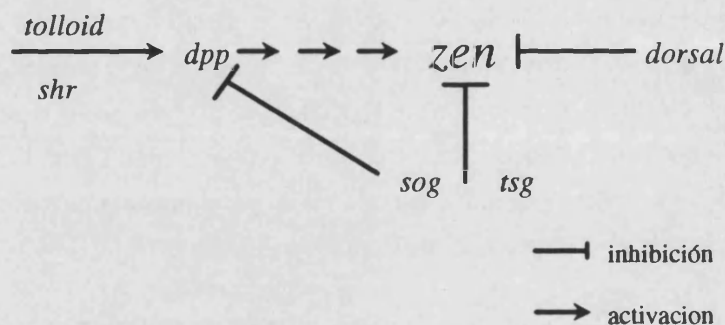
El patrón de expresión de la proteína sigue fielmente el marcado por su mensajero, aunque existe un desfase de unos 45 minutos entre la detección del mensajero (división 10-11) y la primera detección de

la proteína *zen* (división 13-14). La proteína se detecta en el núcleo de las células en las que se expresa el gen, lo que estaría de acuerdo con su función reguladora.

Como hemos visto, en la expresión de *zen* puede distinguirse una fase inicial de expresión, a la que sigue otra de modulación, en la que queda restringida a la región más dorsal del embrión. Este patrón de expresión es el resultado de la interacción de la regulación del gen *dorsal* y el resto de genes zigóticos de la región dorsal. *zerknüllt* es reprimido por el producto del gen *dorsal*, por lo que su expresión inicial se restringe a la región dorsal y en los mutantes *dl* se puede apreciar que la expresión de *zen* varía, abarcando las regiones ventrales. Por este motivo cualquier mutación de los genes maternos del sistema dorsoventral, que afecte a la formación del gradiente *dorsal*, tiene el mismo efecto sobre *zen*, produciéndose una distribución uniforme por el embrión (Rushlow *et al.*, 1987b).

El mantenimiento y la modulación de la expresión de *zen* son el resultado de la acción de los genes zigóticos dorsales. El gen *decapentaplegic* es un activador de la transcripción de *zen*, pues en embriones mutantes para *dpp*, su expresión se inicia pero no se mantiene; puesto que *dpp* es un factor extracelular, esta regulación debe implicar la existencia de una ruta de transducción que lleve la señal al núcleo. *shrew* y *tolloid*, en cuanto que son necesarios para la correcta expresión de *dpp*, también afectan al patrón *zen*. Así, las mutaciones nulas de *tld* y *shr* producen el mismo efecto: la expresión de *zen* se inicia pero al poco tiempo desaparece (Ferguson y Anderson, 1991 y Ray *et al.*, 1991).

Los genes *twisted gastrulation* (*tsg*) y *short gastrulation* (*sog*) afectan a la modulación de *zen*, pues en los mutantes de estos genes, la expresión de *zen* persiste en el ectodermo dorsal, y no se restringe a la amnioserosa. Aunque el fenotipo de ambos genes es similar, el efecto es mucho más dramático en los mutantes *sog*, en los que la persistencia de *zen* es mucho más evidente (Ferguson y Anderson, 1991).



**Figura 9.** Esquema de la regulación del gen *zerknüllt*. Como la activación de *zen* por *dpp* no es directa, se han utilizado varias flechas para representar la existencia de una ruta de transmisión de una señal.

Las diferentes etapas en la regulación de *zerknüllt* responden a distintos elementos de control situados en su promotor. Mediante experiencias de transformación (Doyle *et al.*, 1989), se ha descrito una región distal en el promotor, denominada de represión ventral, en la que se han identificado 4 secuencias específicas para la unión de la proteína *dorsal*, que responden al consenso de la familia



NFκB (Ip *et al.*, 1991). También se ha identificado una región proximal, a la que se unirían los factores responsables del mantenimiento de la expresión y aquellos que controlan el refinamiento de la misma, como *tsg* y *sog* (Rushlow *et al.*, 1989).

La interacción de la proteína *dorsal* con el promotor de *zen* ha sido analizada en profundidad en varios trabajos. La actividad reguladora de *dl* sobre *zen* se produce por la unión de esta proteína a las mismas secuencias diana que existen en el promotor de *twi* y que responden al consenso de la familia NFκB, sin embargo, *twi* es activado por *dorsal* mientras que *zen* es reprimido (Pan y Courey, 1992; Jiang *et al.*, 1992). La actividad primaria de *dl* sería la de un activador, como ocurre en el caso de *twi*, mientras que para actuar como represor debe interaccionar con otras proteínas (Kirov *et al.*, 1993). El estudio comparativo entre varias especies de la región distal del promotor de *zen* ha permitido identificar una serie de secuencias conservadas ricas en AT y situadas al lado de las dianas de *dl*, sobre las que se unirían las proteínas que colaboran con *dl* en la represión ventral de *zen*. Se han detectado, al menos, dos factores nucleares capaces de unirse a estas secuencias (Jiang *et al.*, 1993). Este no sería el único caso en el que *dl* interacciona con otras proteínas ya que se ha comprobado que *dl* actúa con miembros de la familia HLH en la regulación de la expresión de los genes zigóticos del neuroectodermo (Jiang y Levine, 1993; Gonzalez-Crespo y Levine, 1993).

### 3.5. *zen* ESTÁ REGULADO EN LOS POLOS DEL EMBRIÓN POR GENES DEL SISTEMA TERMINAL

Al describir el patrón de expresión de *zerknüllt* mencionamos que en el inicio del mismo se detectaban transcritos y proteína *zen* en los polos del embrión. Esta expresión se produce de modo independiente a la que ocurre en la parte central del embrión, pues ninguno de los genes del sistema dorsoventral que afectan a *zen* produce variación alguna en la expresión del mismo en los polos (Ray *et al.*, 1991). Hay que destacar que en estas regiones coinciden los dominios de genes que en la región segmentada son exclusivamente dorsales o ventrales. Parece lógico pensar entonces que la regulación de *zerknüllt* en los extremos, así como de los otros genes del sistema dorsoventral (*dpp*, *twi*, *sna*...), dependa de un sistema independiente al dorsoventral, y que éste sea el que controla la diferenciación de los extremos del embrión, ésto es, los sistemas terminales anterior y posterior.

Se ha estudiado la distribución de los genes *dpp*, *zen*, *sna*, y *twist* en mutantes para los genes maternos *trunk* (*trk*) y *torso* (*tor*). Estos genes desarrollan su función en la diferenciación de las estructuras del acron y el telson (Klingler *et al.*, 1988). En todos los casos la expresión de los genes estudiados se veía alterada, produciéndose la desaparición de *zen*, *dpp*, *sna*, y *twist* de los polos del embrión, mientras que en la región segmentada la expresión se produce del modo correcto. En el caso de *zen*, la modulación de la expresión se produce, pero de un modo condensado a lo largo del eje AP, faltando la señal que aparece en el lóbulo óptico (Ray *et al.*, 1991).

La función reguladora de los genes del sistema terminal debe ser compleja, pues *dorsal* también se expresa en los extremos del embrión, por lo que la activación de *zen* y *dpp* debe incluir, de alguna manera, la anulación de su actividad represora. El sistema terminal ha de actuar primero modulando la

actividad *dorsal* para que se produzca la expresión de *twist* y *snail* (pues *dl* por sí solo no es capaz de hacerlo). A continuación, otras funciones del sistema terminal han de activar a los genes *dpp* y *zen* (Ray *et al.*, 1991); Casanova (1991) ha demostrado que el sistema terminal produce una reducción de la actividad *dorsal* en los polos del embrión, lo que les permite a éstos adoptar un destino más dorsal, lo que permitiría la expresión de *zen* y *dpp*.

### 3.6. EL PROBLEMA DEL GEN *z2*

Cuando se analizó la estructura molecular de la región *zerknüllt* del complejo Antennapedia de *Drosophila melanogaster* (Rushlow *et al.*, 1987) se encontraron 2 unidades de transcripción, que se denominaron *z1* y *z2*. Ambos genes presentaban una estructura similar, aunque *z2* era ligeramente más pequeño; su patrón de expresión era casi idéntico, mostrando solo algunas diferencias menores y cierto retraso en la misma de *z2*, la comparación de sus secuencias indicaba un origen común, pues sus *homeobox* eran muy parecidas, aunque en el resto del gen apenas existía similitud.

Al realizar experiencias de rescate de mutantes mediante transformación se comprobó que el gen *z1* era suficiente para recuperar la función *zen* completamente, por lo que se identificó a *z1* con el gen *zerknüllt* y, en cambio, la función de *z2* quedaba sin resolver. *z2* no es un pseudogen, puesto que su secuencia de nucleótidos sugiere fuertemente que codifica una proteína, además se han detectado sus transcritos, cuyo patrón de expresión, como ya hemos comentado, es muy parecido al de *z1*.

Según Rushlow, existen varias explicaciones para explicar la presencia de *z2*. La primera es que este gen fuera capaz de realizar él solo la función *zen*; sin embargo, el hecho de que los mutantes *z2* no presenten fenotipo apreciable y tengan un desarrollo normal, estaría en contra de esta idea. Una segunda explicación podría ser que la presencia de *z2* supusiera una ventaja adaptativa, porque favoreciera la acción de *z1*, aunque su función no fuera indispensable. Por último, es posible que *z2* hubiera surgido a partir de *z1* y que se encontrara en proceso de adquirir una nueva función en *Drosophila melanogaster*. En apoyo de esta idea está la existencia de otros casos similares entre genes de desarrollo, como por ejemplo el de *engrailed* e *invected*, implicados en la segmentación del embrión (Coleman *et al.*, 1987). En la comprobación de ésta última hipótesis sería muy interesante estudiar lo que ocurre en otras especies de *Drosophila*, realizando estudios comparativos que podrían aportar más datos sobre la historia evolutiva de estos genes.

### 4. LA COMPARACIÓN ENTRE ESPECIES: UNA APROXIMACIÓN EVOLUTIVA A UN PROBLEMA FUNCIONAL

La teoría sintética de la evolución predice que las mutaciones se producen al azar sobre el genoma, con una distribución aleatoria y que es posteriormente la selección natural la que fijará aquellas mutaciones ventajosas, eliminando aquellos cambios perjudiciales para el organismo. Si aceptamos esta premisa, el estudio comparativo de una determinada secuencia entre 2 especies, lo suficientemente alejadas evolutivamente, se convierte en una buena herramienta para determinar la importancia que esa secuencia tiene para los organismos que la poseen.

#### 4.1. COMPARACIÓN DE SECUENCIAS CODIFICANTES

Cuando se comparan genes homólogos de distintas especies se observan, dentro de la misma secuencia codificante, regiones muy conservadas frente a otras que presentan gran variabilidad. En el primer caso podemos suponer que ha existido una fuerte presión selectiva que ha impedido la aparición de cambios, por lo que es razonable pensar que esa región es importante para la función que realiza ese gen y que los cambios que se produzcan (que normalmente tendrán efectos negativos) serán eliminados. Por otro lado, en las regiones con una baja conservación suponemos, *a priori*, que no ha existido presión selectiva, por lo que los cambios se han ido acumulando y las secuencias han podido divergir sin estar sometidos a constricciones. Se puede deducir entonces, que esa secuencia no era crucial para el gen y los cambios se han tolerado con mayor facilidad.

Este criterio, tomado con todas las precauciones necesarias, ha sido aplicado con éxito al estudio comparativo de numerosos genes de *Drosophila* y se han identificado, de esta manera, dominios que probablemente tengan relevancia estructural o funcional. En muchos de estos trabajos se han comparado secuencias de *Drosophila melanogaster* con las obtenidas en otras especies del género lo suficientemente alejadas: *D. hydei* (60 millones de años), *D. virilis* (60 m.a.), *D. pseudoobscura* y *D. subobscura* (48 m.a.) (Throckmorton, 1975), etc. Considerando la tasa media de mutación espontánea para *Drosophila*,  $10^{-5}$  (Lacadena, 1981), el tiempo transcurrido es suficiente como para que las secuencias susceptibles de divergir lo hallan hecho, por lo que la conservación que se encuentre puede, en principio tener un significado funcional.

Especial relevancia han tenido los estudios comparativos de genes relacionados con el desarrollo, realizados desde una doble perspectiva. Por un lado, siguiendo el criterio establecido anteriormente, as secuencias bien conservadas entre genes homólogos de diferentes especies son susceptibles de tener una función crítica o al menos de cierta importancia funcional o estructural. Por otro lado, el análisis de las secuencias que presentan mayor variabilidad también es útil pues éstas podrían estar directamente implicadas en el proceso de especiación (Dickinson, 1992, Dover, 199 ).

En cualquier caso, existen muchos ejemplos en los que la aproximación evolutiva al estudio de genes del desarrollo ha aportado información útil sobre su organización y modo de actuación. En la tabla II recogemos algunos de estos trabajos, en los que diferentes especies del género se compararon frente a *D.*

*melanogaster*. Hemos incluido el gen objeto de estudio, la especie (o especies) elegida para hacer la comparación, los autores y algún dato destacable de todos los aportados.

En uno de los trabajos pioneros, realizado con el gen *engrailed* (Kassis *et al.*, 1986), se puso de manifiesto la existencia de regiones ricas en Gln e His, denominadas repeticiones CAX (donde X es A, G, C o T), en las que se acumulaba gran parte de la variabilidad detectada a nivel proteico. Un hecho similar se ha detectado en el gen *rough* al comparar los homólogos de *D.melanogaster* y *D.virilis* (Heberlein y Rubin, 1990). Existen otras regiones de secuencias repetidas simples, como las CAX, en otros genes y todas ellas presentan una mayor tasa local de divergencia que las secuencias adyacentes. Este es el caso de las OPA (poliGln) de *bicoid* (Seeger y Kaufman, 1990) y *Antennapedia* (Hooper y Pérez-Alonso *et al.*, 1992), o las encontradas en *hunchback* (Treier *et al.*, 1989). Todos los trabajos citados sugieren que esta alta divergencia proporcionaría un mecanismo para la evolución de las secuencias reguladoras (Dover, 1989). La comprobación de que este tipo de secuencias pueden ser causa de diferencias funcionales se obtuvo al analizar el gen *period* en diversas especies, pues la variabilidad de la secuencia aminoacídica de *period* contribuía al control de las diferencias de comportamiento entre las especies (Colot *et al.*, 1988).

TABLA II

GEN	ESPECIES	AUTORES	DESTACABLE
<i>engrailed</i>	<i>D. virilis</i>	KASSIS ET AL. (1986)	Repeticiones CAX
<i>hunchback</i>	<i>D. virilis</i>	TREIER ET AL. (1989)	Variación en repeticiones simples de aa
<i>bicoid</i>	<i>D.pseudoobscura</i>	SEEGER Y KAUFMAN (1990)	Sin procesado alternativo en <i>D.pseudoobscura</i> . Repeticiones OPA.
<i>rough</i>	<i>D. virilis</i>	HUBERLEIN Y RUBIN (1990)	Repeticiones CAX
<i>sevenless</i>	<i>D. virilis</i>	MICHAEL ET AL (1990)	Dominio extracelular variable
<i>proboscipedia</i>	<i>D.pseudoobscura</i>	CRIBBS ET AL (1992)	Conservación de la estructura
<i>Antennapedia</i>	<i>D. virilis</i> <i>D. subobscura</i>	HOOPER-ALONSO (1992)	Repeticiones OPA. Conservación del procesado alternativo

La comparación entre especies también permite establecer si un determinado proceso es realmente determinante para la función que realiza un gen. El análisis de la secuencia del gen *bicoid* de *D.melanogaster* predecía la existencia de dos productos proteicos distintos, con 5 aa de diferencia, en función de la existencia de un procesado alternativo al principio del exón 3, justo antes del extremo amino terminal de la *homeobox* (Berleth *et al.*, 1988). Procesados de este tipo se habían descrito en los genes *Ultrabithorax* (O'Connor *et al.*, 1988), *Antennapedia* (Bermingham y Scott, 1988) y *labial* (Mlodzik *et al.*, 1988), y se piensa que podrían influir sobre la especificidad de unión al ADN de la *homeobox*. Sin embargo, el análisis de la secuencia *bcd* de *D.pseudoobscura* mostró que el procesado

alternativo no existía en esta especie, pues no encontró ninguna secuencia susceptible de ser el segundo *acceptor* del procesado, por lo que solo era posible una forma, que resultó ser la más corta. Así, aunque en *D. melanogaster* permanece sin aclarar la función de cada producto alternativo, la forma homóloga más pequeña sería suficiente para realizar la función *bicoid* en *D. pseudoobscura* (Seeger y Kaufman, 1990).

#### 4.2. COMPARACIÓN DE SECUENCIAS NO CODIFICANTES

Hasta ahora, nos hemos referido al análisis comparativo de secuencias codificantes, aunque también se han realizado numerosas comparaciones de secuencias no traducidas de genes homólogos. De hecho, la mayoría de trabajos que hemos mencionado anteriormente también incluyen las regiones 5' y 3' no traducidas de los genes estudiados, así como en sus regiones reguladoras. Puesto que las secuencias codificantes no están sometidas generalmente a la presión selectiva, aquí puede que cobre más fuerza el criterio de que la conservación de la secuencia implique alguna importancia funcional que habría impedido su cambio. En estos trabajos se encuentran secuencias bien conservadas en regiones en las que la divergencia es muy elevada y los diferentes autores hablan, en estos casos de *islas de homología*. Estos análisis se vienen realizando sobre las regiones 5' y 3' reguladoras de las unidades de transcripción, por lo que se suelen identificar elementos reguladores de estas unidades, (v.g., motivos de unión para las proteínas que interaccionan con el ADN), motivos estructurales que estabilizan el mensajero, etc.

Como ejemplo de análisis de una región 5' podemos comentar el realizado sobre el gen *fushi tarazu*, en el que inicialmente se hizo una comparación de la región reguladora entre las especies *D. melanogaster* y *D. hydei* (Maier *et al.*, 1990), y posteriormente se amplió (esta vez mediante *dot-plot*) a otras 11 especies del género. En todos los casos se comprobó que los elementos que regulan la expresión de este gen están muy conservados, incluso más que algunos exones. En cambio, cuando se aplicó el mismo análisis a la región reguladora del gen *rosy* (del tipo *housekeeping*) no se apreció conservación alguna. Este hecho llevó a los autores a proponer que "las secuencias de ADN funcionalmente importantes permanecen mejor conservadas a lo largo del tiempo evolutivo que las secuencias funcionalmente menos importantes" (Maier *et al.*, 1993).

El estudio comparativo de la región 3' del mensajero del gen *bicoid* resultó de gran utilidad en el estudio del transporte de este mensajero desde las células nodrizas hasta el embrión. La función del gen *bicoid* es fundamental para la determinación de la parte anterior del embrión de *Drosophila*, pues su producto proteico actúa como un morfógeno de concentración en gradiente, con un máximo de concentración en el extremo anterior. Los siguientes genes interpretan este gradiente para iniciar y modular su expresión por lo que es crucial que éste se establezca correctamente (St. Johnston y Nüsslein-Volhard, 1992). Este proceso depende completamente de la localización del mensajero *bcd* en el polo anterior del embrión durante la ovogénesis. Macdonald y Struhl (1988) demostraron que la localización del ARNm de *bcd* dependía de una secuencia de 625 nucleótidos situada en la región 3' del mismo mensajero; y que esta secuencia era capaz de formar estructuras secundarias aptas para la unión de las proteínas encargadas del transporte. Seeger y Kaufman (1990) analizaron el gen *bcd* de *D. pseudoobscura*, incluyendo la región 3', y encontraron al menos 6 estructuras secundarias potenciales

conservadas entre *D. melanogaster* y *D. pseudoobscura*, con multitud de sustituciones compensatorias. Tal conservación apoyaba con fuerza la idea de que estas estructuras secundarias tenían una función *in vivo*.

Macdonald, en 1990, realizó un exhaustivo estudio de la región e 3' no traducida de *bcd*, comparándola en 7 especies de *Drosophila*. Sus resultados abundaban en lo ya descrito: existían unas secuencias altamente conservadas en las 7 especies y además se mantenía en todas ellas la posibilidad de formar una estructura secundaria, que estaría implicada en el transporte del mensajero. De esta manera, el modelo planteado gracias a las comparaciones entre especies permite una serie de predicciones que se pueden comprobar ya mediante otros métodos como el análisis de mutantes. Finalmente, en el trabajo de Gottlieb (1992) identificó un nonúmero conservado en todos los mensajeros que sufren procesos de transporte: *bicoid* y *oskar* en *Drosophila* y *An2* y *Vg1* en *Xenopus*. Este motivo, YUGUUYGUG, sería general. y estaría presente en los mensajeros de este tipo.

TABLA III

GEN	ESPECIE	REGIÓN	AUTORES
<i>proteínas del corion</i>	<i>Bombyx mori</i>	5'	MISTÁIS Y KAFATOS, 1985
<i>Ultrabithorax</i>	<i>D.pseudoobscura</i> , <i>D.funebris</i> , <i>Musca</i>	5'	WILDE Y AKAM, 1987
<i>engrailed</i>	<i>D. virilis</i>	5'	KASSIS ET AL., 1989
<i>fushi tarazu</i>	<i>D. hydei</i>	5'	MAIER ET AL., 1990
<i>fushi tarazu</i>	11 especies de <i>Drosophila</i>	5'	MAIER ET AL, 1993
<i>bicoid</i>	6 especies de <i>Drosophila</i>	3'	MACDONALD, 1990
<i>varios</i>	<i>Xenopus</i>	3'	GOTTLIEB, 1992

#### 4.3. COMPARACIÓN DE PATRONES DE EXPRESIÓN

La comparación de genes en distintas especies no se reduce únicamente a la secuencia, sino que también es posible comparar sus patrones de expresión (de los mensajeros o de las proteínas que codifican) mediante diferentes técnicas: hibridación *in situ*, detección con anticuerpos, perfiles temporales en geles etc. Un patrón temporal o espacial distintos indican la existencia de diferencias en la regulación de los genes y, si nos referimos a genes de desarrollo, podemos estar en frente de los mecanismos que han llevado a la diferenciación de esas especies (Dickinson, 1990).

Un ejemplo de esto nos lo ofrece la comparación de los patrones de expresión de la proteína *hunchback* en *D. melanogaster* y *D. virilis* (Treier *et al.*, 1989). Aunque la expresión inicial era similar en ambas especies (una franja amplia en la región central del embrión) en estadios posteriores los patrones presentaban aspectos bastante distintos. Los autores indican que este hecho supone una regulación diferencial de este gen en cada especie



## OBJETIVOS



## OBJETIVOS

---

Este proyecto de Tesis Doctoral se enmarca dentro de uno más amplio, cuyo objetivo final es la caracterización completa del complejo Antennapedia de *D.subobscura*. El proyecto se inició con la caracterización molecular del gen *Antennapedia* en esta especie, lo que constituyó la Tesis Doctoral de Manuel Pérez Alonso (1989). La continuación del mismo es este trabajo, que se va a centrar en una de las regiones más interesantes del complejo, en función de nuevos datos aparecidos desde entonces.

A lo largo de la Introducción, hemos intentado incidir en aquellos aspectos más relevantes de cara a la comprensión de los objetivos que vamos a plantear. Por un lado, hemos señalado aquellos aspectos que convierten al complejo Antennapedia en algo singular dentro de los complejos de genes homeóticos descritos hasta ahora. Por otro, hemos presentado en detalle el sistema genético que controla la diferenciación dorsoventral del embrión de *Drosophila*, pues creemos necesario conocer en profundidad el contexto en el que actúa el gen elegido para nuestro análisis, así como los problemas planteados sobre su regulación y su función.

De esta manera, planteamos este proyecto a dos niveles distintos: nivel funcional y nivel estructural. En primer lugar, aplicaremos la aproximación evolutiva al análisis funcional del gen *zerknüllt*, intentando, mediante la comparación entre especies, aportar nuevos datos sobre los dominios funcionales y la regulación de este gen. En segundo lugar, describiremos la estructura de la región *zerknüllt* del complejo Antennapedia de *D.subobscura*, lo que nos permitirá conocer nuevos aspectos sobre la evolución del mismo y del propio gen *zerknüllt*.

Esta declaración de intenciones se concreta en los siguientes objetivos:

1. Aislamiento de clones genómicos de la región *zerknüllt* de *D.subobscura*, que contengan tanto las secuencias codificantes como las reguladoras.
2. Análisis de la secuencia codificante del gen *zerknüllt*, mediante la comparación entre las especies *D.melanogaster* y *D.subobscura*.
3. Estudio de la región promotora del gen *zerknüllt*, intentando determinar los diferentes elementos reguladores del mismo mediante la comparación interespecífica.
4. Análisis del patrón de expresión de los mensajeros *zen* durante el desarrollo embrionario de *D.subobscura*. Para ello realizaremos la comparación con el descrito para *D.melanogaster*.
5. Determinación de existencia del gen *z2* en el genoma de *Dsubobscura*.
6. Estudio de la estructura de la región *zerknüllt* del complejo Antennapedia de *D.subobscura*: búsqueda de los genes adyacentes a *zen*, comprobación de la orientación y distancia entre ellos.



### *3. MATERIALES Y MÉTODOS*



Casi todas las técnicas empleadas en este trabajo se han realizado siguiendo los protocolos de Maniatis *et al.* (1982), Ausubel *et al.* (1988) y Sambrook *et al.* (1989). Hemos detallado especialmente aquellas técnicas descritas por primera vez o aquellas en las que se ha realizado alguna modificación.

Los reactivos y medios de cultivo se han preparado por procedimientos estándar, según las instrucciones de Maniatis *et al.* (1982) y Sambrook *et al.* (1989). Los enzimas de restricción y modificación del DNA, proporcionados en la mayoría de los casos por Boehringer Mannheim (B.M.) y Pharmacia, se han utilizado en las condiciones aconsejadas por los proveedores.

## 1. MATERIAL BIOLÓGICO

### 1.1. *Drosophila*

Todo el trabajo experimental se ha realizado con la cepa H271 de *Drosophila subobscura*, que pertenece al grupo *obscura* de este género. La cepa es originaria de Finlandia.

### 1.2. *E. coli*

Se han utilizado dos cepas de *Escherichia coli*:

**K802:** supE hsdR galmetB (Wood 1966). Empleada en la propagación del bacteriófago  $\lambda$ EMBL4.

**DH5 $\alpha$ :** supE44  $\Delta$ LacU169 (fi80 lacZ dM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 Thi-1 relA1 (Hanahan 1983).

Ha sido la cepa utilizada como célula competente para la clonación y crecimiento de plásmidos. Permite  $\alpha$ -complementación con el extremo amino-terminal de la  $\beta$ -galactosidasa codificada por los plásmidos pUC.

## 2. VECTORES DE CLONACIÓN

### 2.1. EMBL4.

Es un vector de reemplazamiento derivado del bacteriófago  $\lambda$  (Frischauf *et al.* 1983). Se usa habitualmente para clonar grandes fragmentos (de 12 a 20 Kb) de DNA genómico. Es el vector en el que se clonó el DNA genómico de la cepa H271 de *Drosophila subobscura* cuando se hizo la genoteca correspondiente (Marfany, 1991).

El DNA genómico se cortó con la enzima *Mbo*I, que es un isoesquizómero de *Bam*HI, por lo que los fragmentos obtenidos se subclonaron en el sitio *Bam*HI del vector EMBL4. El inserto completo se puede liberar digiriendo con la enzima *Eco*RI.

### 2.2. pUC18 y pUC19.

Estos vectores pertenecen a una familia de plásmidos que contienen un sitio de clonación múltiple, con dianas para varios enzimas de restricción. Este sitio está situado dentro de la región codificante para el extremo amino terminal de la  $\beta$ -galactosidasa. Presentan  $\alpha$ -complementación, lo que permite seleccionar las bacterias con plásmidos recombinantes, utilizando un medio indicador compuesto por IPTG y Xgal.

Ambos plásmidos confieren a la bacteria huésped resistencia a la ampicilina y se diferencian por poseer el sitio de clonación múltiple en orientación inversa.

### 3. SONDAS UTILIZADAS.

#### 3.1. Sondas Procedentes De *D.melanogaster*

Para llevar a cabo el rastreo original sobre la genoteca de *D.subobscura* se empleó una sonda cedida por Michael Levine, de la Universidad e Columbia (Rushlow *et al.*, 1987) que contiene un cDNA del gen *zerknüllt* (pDmzen), clonado en el vector PUC18 (Rushlow *et al.*, 1987). La sonda también se usó para las hibridaciones *in situ* realizadas en embriones.

Para las hibridaciones en filtro con DNA genómico se aisló un fragmento *EcoRI-BstEII* de la sonda anterior, se modificaron los extremos convirtiéndolos en romos (en una reacción con Klenow y dNTPs) se clonó en el sitio *EcoRI* de PUC19. Este fragmento contiene la región 3' del gen *zen*, quedando excluida la caja *homeo*. Esta sonda la denominamos pDmzenHB-.

La sonda del gen *z2* fue proporcionada por Steve Small (del laboratorio del Dr. Levine). Esta sonda (pGz2Nde) es un derivado del vector pGEM que contiene la región codificante del gen clonada en los sitios *HindIII* y *NdeI*.

Como en el caso anterior, para las hibridaciones en filtro con DNA genómico se aisló un fragmento *AccI*, que contiene la región 3' del gen *z2*, y se subclonó en PUC19. Esta sonda la denominamos pDmz2HB-.

En algunas hibridaciones se usó la sonda c53.46.6, que contiene un cDNA del gen *bicoid* (*bcd*), clonado en un plásmido pGEM1 y cedida por Nüsslein Volhard el Instituto Max Plank de Tübingen (Nüsslein Volhard *et al.* 1988)

Para la realización del rastreo con el gen *labial* empleamos la sonda PSC241 cedida por Walter Gehring de la Universidad de Basilea (Mlodzik *et al.*, 1988) y que contiene un cDNA de este gen.

La sonda PB4 contiene una fragmento genómico de DNA de 4 Kb e incluye el gen *z2* y los exones 1 y 2 del gen *proboscipedia*. Esta sonda nos fue proporcionada por David Cribbs, de la Universiad de Indiana (Cribbs *et al.*, 1992).

#### 3.2. Sondas procedentes de *D.subobscura*.

En muchos casos, hemos utilizado como sonda DNA procedente de algunos de los clones de  $\lambda$  aislados en los rastreos de la genoteca de *D. subobscura*. Habitualmente eran fragmentos específicos de dichos clones, bien subclonados en plásmido (pUC18/pUC19), o bien como insertos purificados directamente a partir de los clones del fago  $\lambda$ . En al mayoría de los casos se empleaban en la elaboración de los mapas de restricción de estos mismos clones.

Para la extensión de la región clonada de *D.subobscura* mediante paseo cromosómico se aisló y subclonó en PUC18 un fragmento *EcoRI* del clon  $\lambda$ DsTU1. El fragmento es de 3 Kb y la sonda la denominamos pDsU1.11. En los restantes pasos del paseo cromosómico empleamos como sonda los fragmentos situados en el extremo del clon correspondiente; la nomenclatura empleada indica el nombre del clon del que proviene el fragmento y el número de la extracción de DNA plasmídico en la que se obtuvo (ver figura 32 de Resultados).

La hibridación *in situ* en embriones y en cromosomas se realizó con un fragmento *EcoRI-BamHI* de 1.6 kb, procedente del clon  $\lambda$ DsW1, subclonado en PUC18, que contiene la región 5' del gen *zen*, incluyendo la caja *homeo*; este fragmento se ha secuenciado totalmente.

Para la hibridación *in situ* sobre los cromosomas de *D.subobscura* empleamos como sonda fragmentos de restricción obtenidos a partir de clones de la genoteca de esta especie y que mostraban la mayor intensidad en la señal de hibridación frente a las sondas de *D.melanogaster*. Para localizar *proboscipedia* la sonda usada fue pDsC2.6, procedente de una digestión *EcoRI-BamHI* del clon  $\lambda$ DspbC2, subclonado en PUC19. Para el gen *labial* empleamos un fragmento procedente de la digestión *EcoRI-BamHI* del clon  $\lambda$ DslabD1, subclonado en PUC19 y denominado pDsD1.7.

### 3.3 Oligonucleótidos.

Se diseñó un oligonucleótido específico para realizar un rastreo sobre la genoteca de *D.subobscura*. La secuencia de éste es:

CAAAGCCATGCAAGAGGTCTGCAGC

y corresponde al extremo 5' del exón 2 del gen *proboscipedia* (*pb*) de *D.pseudoobscura* (Cribbs *et al.*, 1992). Esta sonda se denominó pbOy con ella se pretendía seleccionar clones del fago  $\lambda$  con secuencias homólogas al gen *pb*.

## 4. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCICOS

### 4.1. DNA genómico de *Drosophila*

La extracción de DNA genómico se ha realizado siguiendo el método de Junakovic *et al.* (1984), modificado para 150 individuos adultos. Las moscas se homogeneizan en un tampón Tris-HCl 0.1 M, EDTA 0.1 M, pH 9 y el producto se incuba a 65°C en presencia de SDS. El DNA se obtiene precipitando con isopropanol a temperatura ambiente. Posteriormente la muestra se trata con RNasa para eliminar el ARN contaminante.

### 4.2. DNA plasmídico

La extracción de DNA plasmídico a pequeña escala se ha hecho por el método de lisis alcalina descrito en Sambrook *et al.* (1989).

Estas minipreparaciones se han realizado para obtener los DNAs plasmídicos usados como molde en los experimentos de secuenciación y en las reacciones de marcaje no radiactivo (cuando se iban a usar como sonda). El rendimiento obtenido era aproximadamente de 3 a 5  $\mu$ g de plásmido por ml de cultivo.

### 4.3. DNA de bacteriófago $\lambda$

Hemos utilizado el método descrito en Ausubel *et al.* (1988), con ligeras modificaciones (Pérez-Alonso 1989), para la extracción de DNA de bacteriófago  $\lambda$ . Este método parte de lisados líquidos de pequeño volumen (50 ml), obteniéndose de 50 a 100  $\mu$ g de DNA.

Las lisis más eficientes se conseguían cuando la aireación del cultivo era muy elevada. Para ello los cultivos se incubaban en erlenmeyers de 1 l de volumen y la agitación era muy intensa (>300 rpm).



## 5. MARCAJE DE DNA

Hemos empleado para la realización de todo el trabajo un método **no radiactivo**. Este método emplea un análogo de un nucleótido con una molécula de digoxigenina incorporada.

La digoxigenina es un esteroide de origen vegetal, y la detección de la sonda marcada se realiza mediante una reacción con un anticuerpo que reconoce a la digoxigenina, y que está conjugado a una fosfatasa alcalina. El anticuerpo unido a la digoxigenina se detecta con una reacción de color provocada por este enzima.

El protocolo utilizado para el marcaje de sondas por este método ha sido el recomendado por el proveedor (B.M., Cat.No. 1093657). Este método está basado en la reacción de *oligolabelling*, descrita por Feinberg y Vogelstein (1983).

Para marcar la sonda pbO, un oligonucleótido de 25 pares de bases, se le añadió una cola poliA con el análogo con digoxigenina intercalado. Esta cola se añadió mediante la reacción catalizada por la transferasa terminal. En la reacción, además de 50 pmoles de oligonucleótido, se añade dATP y dUTP-dig en una proporción adecuada para que se incorporen varias moléculas de digoxigenina por oligonucleótido.

## 6. HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

### 6.1. HIBRIDACIÓN EN FILTRO

#### 6.1.1. Condiciones de hibridación

Las hibridaciones se han realizado en tubos de vidrio, incubando en un horno giratorio de la marca Bacher. Las condiciones de hibridación, lavados y detección han variado en función de la identidad de secuencia y de la complejidad de los DNAs.

Se ha utilizado la solución de hibridación recomendada por el proveedor: SSC 5X, N-Laurilsarcosina 0.1%, SDS 0.02%, agente de bloqueo (proporcionado por el *kit*) 1%. La concentración de sonda marcada ha sido de 20 ng por ml de solución de hibridación y el volumen de solución de hibridación de 2.5 ml por cada 100 cm<sup>2</sup> de filtro.

Las hibridaciones se ha efectuado durante un tiempo de 12 a 16 h; una temperatura de 65°C, precedidas de una prehibridación de 1 h, en las mismas condiciones que la hibridación pero sin sonda marcada.

Una vez utilizadas, las sondas se recuperaban y se guardaban a -20°C, pues esta técnica permite su reutilización (hasta 5 ó 6 veces), previa desnaturalización a 100°C.

En el caso de la hibridación con el oligonucleótido pbO, la temperatura de hibridación se determinó a partir de la fórmula empírica:

$$T_f = 81.3 - 16.6 \log[Na] + 0.41 \% GC$$

Las concentraciones de Na se calcularon en base a las de SSC y SDS usadas en los lavados (ver sección siguiente); la solución de hibridación fue la estándar.

La temperatura de fusión fue 62°C, la temperatura de hibridación usada fue 52°C, 10 °C inferior a la primera.

#### 6.1.2. Condiciones de lavado

Los lavados se han realizado en cubetas de plástico, que se introducían en baños termostáticos con agitación.

Para sondas homólogas a las secuencias de DNA los lavados han sido: 2x5 min. en SSC 2X, SDS 0.1% a temperatura ambiente, y 2x15 min., de elevada exigencia de homología, en SSC 0.1X, SDS 0.1% a 65°C.

Para sondas heterólogas los lavados a temperatura ambiente se mantuvieron, los siguientes lavados se hicieron en distintas condiciones, según la exigencia de homología que requerida en cada caso.

En las hibridaciones de DNA de *D.subobscura* (de virus, genómico...) con sondas de *D.melanogaster* los lavados fueron 2x15 min. en SSC 0.5X, SDS 0.1% a 50°C.

En las realizadas con la sonda pbO las condiciones se hallaron mediante hibridaciones control con genómicos de *D.subobscura*. Se obtuvo así la combinación adecuada de temperatura y concentración de sales necesaria para obtener una señal única sobre el DNA genómico de *D.subobscura*. Finalmente estas condiciones fueron 2x15 min. en SSC 0.5x, 0.1% SDS a 54°C. En este caso, tanto la hibridación como los lavados se hicieron en cubetas selladas en un baño termostático con agitación.

Con las sondas pDmzenHB- y pDmz2HB-utilizamos distintas condiciones de lavado en las hibridaciones frente a digestiones de DNA genómico de *Drosophila*. Las temperaturas fueron de 50, 60 y 64°C y las concentraciones de SSC de 0.5X y 0.2X SSC.

### 6.1.3. Detección

La detección se llevó a cabo siguiendo el método recomendado por el distribuidor. En primer lugar, el filtro se bloquea para evitar la unión inespecífica del anticuerpo, en segundo lugar se incuba con un anticuerpo que reconoce a la molécula de digoxigenina y que está conjugado a una fosfatasa alcalina, y finalmente, se produce el revelado mediante la adición de dos compuestos, NBT y X-fosfato. La acción enzimática, da lugar a un producto de color azulado apreciable a simple vista.

Las reacciones de color se desarrollaron durante tiempos muy variables, oscilando entre 1/2 h y 24 h, en función de la complejidad del DNA y de la sonda utilizada.

## 6.2. HIBRIDACIONES IN SITU

### 6.2.1. HIBRIDACIONES IN SITU EN EMBRIONES DE DROSOPHILA

Esta técnica se ha usado para comparar el patrón de expresión del gen *zen* en *D.melanogaster* y *D.subobscura*, detectando los mensajeros con una sonda marcada con digoxigenina e hibridando sobre embriones completos. El protocolo usado ha sido el de Tautz y Pfeifle (1989), modificado según Artero *et al.* (1992).

Los huevos, de la edad requerida, se decorionizan con lejía al 50% y se fijan con heptano y paraformaldehído al 10%. Una vez fijados se pueden conservar a -20°C en etanol absoluto.

El marcaje de la sonda se realiza por métodos estándar, y en la solución de hibridación se añade formamida (50%) y Tween 20 (0.1%) con lo que la temperatura de hibridación fue de 37°C.

Los lavados se hicieron en tampón PBT a 65°C. La detección se realizó incubando los embriones con la solución de color durante al menos 6 h a 37°C.

Obtenida la señal, los embriones se montaron en preparaciones con glicerol al 80%, para su posterior estudio en un microscopio Nikkon con óptica Nomarsky.

### 6.2.2. HIBRIDACIÓN *IN SITU* EN CROMOSOMAS POLITÉNICOS DE *D.subobscura*

La localización cromosómica de los genes *proboscipedia*, *zerknüllt* y *labial* la realizamos mediante hibridación *in situ* en los cromosomas politénicos de *D.subobscura*.

Para obtener preparaciones de cromosomas politénicos seguimos el protocolo descrito en Terol *et al.* (1991), que está basado en el de Atherton y Gall (1972).

La hibridación se llevó a cabo según el protocolo de De Frutos *et al.* (1991), que emplea el método no radiactivo de la digoxigenina.

## 7. CLONACIÓN DE DNA EN *E. coli*

### 7.1. Preparación del vector de clonación

Para preparar los vectores que hemos utilizado en este trabajo partíamos de plásmidos purificados por ultracentrifugación en gradiente de CICs.

El protocolo seguido en la preparación es el descrito en Pérez-Alonso (1989). En éste, la defosforilación del plásmido con fosfatasa alcalina se realiza simultáneamente con la digestión con la enzima de restricción elegida, añadiendo la fosfatasa alcalina de intestino de buey a la reacción de digestión.

### 7.2. Ligación

La ligación del vector con el fragmento de DNA a clonar se ha hecho con la ligasa del fago T4 y el tampón de ligación suministrados por B.M.

Las condiciones de reacción fueron 18°C durante 12 h, en un volumen 10 µl.

### 7.3. Transformación de células competentes

Para introducir el plásmido quimérico en las células competentes hemos seguido dos protocolos.

Para el primero, la preparación de bacterias competentes se ha hecho según el protocolo descrito en Maniatis *et al.* (1982), utilizando CaCl<sub>2</sub>. Las células competentes se mantienen a -80°C. La cepa utilizada ha sido la DH5α.

Este protocolo está basado en el descrito por Sambrook *et al.* (1989). Tras incubar en hielo la mitad de la mezcla de ligación con 50 µl de células, se daba un choque térmico (42°C) durante 2 min. a la mezcla; las bacterias transformadas se incubaban durante 1 h en un 1 ml de LB precalentado a 37°C y aireado por agitación intensa en vórtex.

El segundo protocolo emplea la técnica de electroporación, para la que se han seguido las indicaciones del proveedor del electroporador, el *E.coli* Pulser™ de BIO-RAD.

Un volumen de 40 µl de células competentes con 1 ml de ligación es sometido a un choque eléctrico (1.6 Kv) durante 5 milisegundos a baja temperatura (0 a 4°C). La incubación se realiza a 37°C en 1 ml de medio SOC durante una hora. Los rendimientos obtenidos son muy altos, oscilando entre 10<sup>7</sup> y 10<sup>8</sup> transformantes por µ de DNA.

En este caso la preparación de las células competentes (DH5α) se hace según el protocolo de Dower *et al.* (1988). El cultivo de células competentes se resuspende en glicerol al 10% a una concentración de 1-3 10<sup>10</sup> células/ml, conservándose a -80°C.

#### 7.4. Selección de colonias recombinantes

Aproximadamente, de unos 100 a 400 µl del cultivo (según el método de transformación empleado) se sembraban en placas de LB con ampicilina (50 µg/ml de cultivo) y con medio indicador, compuesto por los productos IPTG y X-Gal. Las colonias recombinantes se pueden distinguir fácilmente por el color.

Posteriormente, estas colonias se cultivaban en 4 ml de LB con ampicilina (50 mg/ml) durante 12 h a 37°C, realizando luego una extracción de DNA plasmídico a pequeña escala (ver apartado 4.2), para comprobar la naturaleza de dicho DNA.

### 8. ELECTROFORESIS DE DNA

#### 8.1. Electroforesis en geles de agarosa

Hemos seguido fundamentalmente los protocolos descritos en Ausubel *et al.* (1988) y Sambrook *et al.* (1989). La agarosa ha sido suministrada por B.M.

Hemos empleado geles de agarosa del 0.8%, preparados en tampón TBE 1X y en presencia de bromuro de etidio (0.5 mg/ml); hemos usado el mismo tampón en las cubetas de electroforesis.

El tampón de carga de las muestras ha sido: glicerol 50%, azul de bromofenol 0.5%, EDTA 10 mM (10x). El patrón de peso molecular y de concentraciones de DNA empleado ha sido el DNA del fago λ digerido con la enzima de restricción *HindIII* (B.M., Cat.No. 1292609).

#### 8.2. Electroforesis en geles de acrilamida

Los geles de acrilamida han sido los empleados en la secuenciación del DNA. Hemos usado el sistema de electroforesis Macrophor de Pharmacia-Lkb, con geles del 8% de acrilamida (concentración final).

Los geles se han preparado a partir de una mezcla con todos los componentes (instagel), excepto el persulfato amónico y el TEMED. La composición del instagel es la siguiente: 8% de acrilamida (a partir de una solución stock de acrilamida:bisacrilamida (19:1) al 40%), urea 7 M y TBE 1X. La solución es estable varios meses en la oscuridad a temperatura ambiente. Para la polimerización de los geles se ha utilizado PSA (B.M., Cat.No. 103735) a una concentración final del 0.1%, y de TEMED (B.M., Cat.No. 100139), dependiendo del volumen de instagel utilizado.

Se han preparado dos tipos de geles, unos de 0.2 mm de grosor, y otros en gradiente de grosor de 0.2 a 0.4 mm.

### 9. PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Para aislar el fragmento de DNA (procedente de plásmidos o fago) se realiza una electroforesis preparativa en gel de agarosa; se corta el menor fragmento posible de agarosa que contenga el DNA de interés, continuando entonces con la técnica de electroelución.

Para ello, hemos seguido el protocolo descrito en Maniatis *et al.* (1982), utilizando como tampón de diálisis TBE 0.5X. Los tubos de diálisis se han preparado según Sambrook *et al.* (1989).

Una vez electroeluidos los fragmentos de DNA de la matriz de agarosa se procedía a su extracción con fenol y precipitación con etanol absoluto. El rendimiento ha sido, aproximadamente, un 50% del DNA de partida.

## **10. RASTREOS DE LA GENOTECA DE *D.subobscura*.**

### **10.1. Preparación de bacterias para la infección con fago $\lambda$ (*plating bacteria*)**

Para la propagación de los fagos se ha utilizado la cepa de *E.coli* K802 descrita en el apartado 1.

El protocolo utilizado para la preparación de bacterias aptas para la infección con bacteriófago  $\lambda$  ha sido el descrito en Maniatis *et al.* (1982) y Sambrook *et al.* (1989). Las células se conservaban a 4°C y eran útiles hasta 4 semanas después de su preparación.

### **10.2. Plaqueado de las genotecas**

Se necesitan 10000 clones independientes del fago  $\lambda$  para obtener un equivalente genómico en *D.melanogaster*. En nuestro caso, para tener la seguridad de rastrear un número suficiente, partimos de 100.000 clones de la genoteca genómica de *D.subobscura*.

El plaqueado se realizó en placas Petri de 90 mm de diámetro según el protocolo descrito en Kaiser y Murray (1985), utilizando en cada infección de 100 a 200  $\mu$ l de células y  $10^4$  virus (el volumen empleado depende del título de la genoteca en el momento de usarla).

### **10.3. Aislamiento de clones positivos**

El aislamiento de clones positivos se realizó por el método de Benton y Davis (1977), descrito por Kaiser y Murray (1985) y Sambrook *et al.* (1989). Se realizó una modificación, consistente en utilizar AcNa 3 M como solución neutralizante (Pérez-Alonso 1989).

Las condiciones de hibridación utilizadas con las sondas pDmzen y pDmz2HB- fueron las descritas en el apartado 7.1. Los lavados se realizaron según son descritos en el apartado 7.2 para sondas heterólogas.

En el rastreo realizado con el oligonucleótido pbO, se usaron unas condiciones de hibridación y lavados determinadas por nosotros (ver secciones 7.1 y 7.2)

En el paseo cromosómico se utilizaron las condiciones de hibridación y lavados descritas en los apartados 7.1 y 7.2 para sondas homólogas.

Debido al gran número de fagos cultivado en cada placa, no era posible recuperar aislado el clon positivo. Para proceder a su purificación, se utilizó el método descrito anteriormente, partiendo de un número de clones que permitiera distinguir calvas individuales (entre 200 y 400).

Una vez identificados y purificados los clones positivos, se realizó una extracción de DNA de los mismos (ver apartado 4.1.3) para su posterior análisis.

## **11. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN**

Una vez obtenido el DNA de los clones positivos, procedimos a determinar la estructura de los mismos mediante la elaboración de sus mapas de restricción.

Las enzimas empleadas han sido *EcoRI*, *BamHI* y *SalI*, ninguna de las cuales corta el vector; *EcoRI* libera el inserto completo. Para determinar la situación de los puntos de corte realizamos digestiones sencillas y dobles con todas las enzimas. A partir de los fragmentos obtenidos elaborábamos un mapa previo, en el que ya intentábamos identificar fragmentos comunes a varios clones.

Aquellos fragmentos considerados especialmente informativos, se aislaron mediante electroelución (ver sección 11), se marcaron con digoxigenina y se hibridaron frente a las distintas digestiones de los clones. Esto nos permitió determinar con certeza la identidad de cada fragmento, y su posición relativa respecto los demás. Para cada mapa, como mínimo, empleamos 3 sondas distintas, con el fin de asegurar la certeza de los mapas al máximo.

En algunos casos se hicieron digestiones *HindIII* y *EcoRI-HindIII* para determinar los fragmentos de los extremos, pues la primera también corta en el vector.

## 12. OBTENCIÓN DE DELECCIONES DIRECCIONALES

Para aplicar esta técnica hemos utilizado el kit *Double-stranded Nested deletion Kit* de Pharmacia (Cat.No. 27-1691-01). Se ha seguido el protocolo recomendado por el proveedor, descrito originalmente por Henikoff (1984), con algunas modificaciones descritas en Paricio (1993).

Hemos usado este procedimiento para secuenciar dos fragmentos del clon  $\lambda$ DsW1, uno de 1.6 Kb (*EcoRI-BamHI*) y otro de 3 Kb (*EcoRI*). Ambos fragmentos se subclonaron en pUC18 y pUC19, para obtener las delecciones seriadas en ambos sentidos. El clon del fragmento de 1.6 Kb en pUC18 se denominó pDsW1.13; en pUC19, pDsW1.27. Los clones del fragmento de 3 Kb fueron, respectivamente, pDsW1.35 y pDsw1.38.

El clon pDsW1.13 se digirió primero con *HindIII*, se rellenaron los extremos con tionucleótidos ( $\alpha$ SdNTPs) en una reacción con Klenow, se hizo una extracción con phenol-cloroformo y el DNA se digirió finalmente con *BamHI*. Las delecciones se hicieron en intervalos de 2 min, con un tiempo total de 50 min. Con el clon pDsW1.27 se realizó el mismo proceso, aunque las enzimas de restricción usadas fueron *EcoRI* y *BglIII*.

También fue necesario aplicar la reacción de protección con tionucleótidos a los clones pDsW1.35 y 38. En este caso las enzimas usadas fueron *Sall* y *BamHI*. Los intervalos de tiempo en la reacción con la exonucleasa fueron iguales a los anteriores

## 13. SECUENCIACIÓN DE DNA

La secuenciación del DNA se ha realizado sobre las dos cadenas del molde en todos los casos. Hemos usado el método descrito por Sanger *et al.* (1977), utilizando como nucleótido radiactivo el análogo  $\alpha$ - $^{35}$ S-dATP (Amersham, Cat.No. SJ 1304).

El enzima utilizado en esta técnica ha sido la DNA polimerasa del fago T7 (Pharmacia, Cat.No. 27-0985-01). Los cebadores empleados para la secuenciación de los clones plasmídicos han sido los universales directo y reverso -22 (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3' y 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'), y los cebadores directo y reverso -60 (5'-CGAAAGGGGGATGTGCTGCAA-3' y 5'-ACACTTTATGCTTCCGGC-3'), estos últimos diseñados por Paricio (1993). En algunos casos hemos utilizado oligonucleótidos sintéticos para rellenar huecos en las secuencias. Todos los oligonucleótidos utilizados han sido suministrados por MedProbe.

### 13.1. Preparación de los plásmidos

El tratamiento a que han sido sometidos todos los plásmidos antes de la secuenciación, ha consistido en una desnaturalización en presencia de NaOH. Para cada reacción de secuenciación se han utilizado 2  $\mu$ g de DNA plasmídico procedente de minipreparación. El protocolo seguido ha sido el recomendado por el libro de

instrucciones del *T7 sequencing kit* de Pharmacia (Cat.No. 27-1682-01) modificado según consta en Paricio (1993)

### 13.2. Reacciones de secuenciación

Hemos realizado las reacciones de secuenciación siguiendo el protocolo recomendado por el proveedor del kit anteriormente mencionado, también con las modificaciones hechas en Paricio (1993)

### 13.3. Condiciones de electroforesis

Los geles de 0.2 mm se desarrollaron a un voltaje de 1500 V durante 16 h (algunas veces hasta 22 h), y los de gradiente de grosor a 2500 V durante 2-3 h. Los geles de grosor uniforme, desarrollados más tiempo nos permitían hacer lecturas más largas, en los geles cortos podíamos identificar el inicio de la secuencia. De este modo hemos conseguido lecturas de 300 a 500 pb por cada reacción de secuenciación.

### 13.4. Fijación, secado y autorradiografía

La fijación de los geles ha consistido en 20 min. de agitación en una solución de ácido acético al 10%.

La autorradiografía se realizó con película Valca (Cat.No. HPX-44) durante aproximadamente 48 h. El revelado se efectuó en un revelador automático de la casa AGFA (mod. CURIX60)

## 14. ANÁLISIS DE SECUENCIAS

El análisis de las secuencias obtenidas a lo largo de todo el trabajo ha sido realizado con los programas del paquete GCG de la Universidad de Wisconsin, instalado en un equipo tipo VAX (Digital) del Servicio de Bioinformática de La Universitat de València. Los programas más utilizados han sido:

COMPARE y DOTPLOT: el primero realiza los cálculos para la elaboración de los gráficos DOT-PLOT.

FINDPATTERNS: permite encontrar un determinado consenso en una o varias secuencias con un determinado número de desapareamientos.

FOLD: calcula la estructura secundaria de una cadena de RNA.

GAP Y BESTFIT: para los alineamientos entre dos especies. GAP realiza el alineamiento de las dos secuencias completas, mientras que BESTFIT se limita a las zonas en las que el alineamiento es óptimo.

GELSTART, GELENTER, GELOVERLAP, GELASSEMBLE y GELVIEW son los programas utilizados en la elaboración de los proyectos de secuenciación.

PUBLISH: permite realizar presentaciones elaboradas de la secuencias.

SEQED: editor de secuencias.

TRANSLATE: traduce una secuencia de DNA a aminoácidos

Para la realización de los alineamientos múltiples de secuencias se ha utilizado el programa CLUSTAL. El cálculo de las distancias genéticas se ha hecho con el programa DISTANCE, de Agustín López.

## ***4. RESULTADOS***





## 4.1 IDENTIFICACIÓN Y OBTENCIÓN EN *D.subobscura* DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS AL GEN *zerknüllt*

### 4.1.1. IDENTIFICACIÓN, MEDIANTE SOUTHERN BLOT DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS AL GEN *zerknüllt*

Para determinar la existencia de secuencias homólogas al gen *zerknüllt* en el genoma de *D.subobscura*, realizamos una extracción de DNA total de *D.subobscura*, digerimos con la enzima *EcoRI*, y aplicamos la técnica de *Southern blot*. La hibridación se hizo en condiciones estándar y los lavados se realizaron a 55°C y 0.5xSSC. La sonda que empleamos fue un cDNA del gen *zerknüllt* de *Drosophila melanogaster* (pDmzen), proporcionada por Michael Levine, de la Universidad de (Rushlow *et al.*, 1987) cuyo grupo había caracterizado este gen en *D.melanogaster*.

Como resultado obtuvimos una banda que podría corresponder al gen *zerknüllt*, aunque aparacían otras señales en la carrera que podrían de berse a la hibridación con las *homeobox* de otros genes (Fig.10A).

### 4.1.2. RASTREO DE LA GENOTECA DE *D.subobscura*

Una vez establecida la existencia de secuencias homólogas a *zen*, realizamos un rastreo de una genoteca de DNA genómico de *Drosophila D.subobscura* cedida por Gemma Marfany y Roser González, del Departamento de Genética de la Universidad de Barcelona. Las condiciones empleadas para el rastreo se indican en Materiales y Métodos, sección 6.1, la sonda usada fue pDmzen, descrita en el apartado anterior.

Como resultado del rastreo obtuvimos 25 clones del bacteriófago  $\lambda$ , que procedimos a analizar mediante análisis de restricción con la enzima *EcoRI*, tras la extracción de su DNA. Los 25 clones presentaban un patrón de bandas diferente, aunque algunos de ellos compartían algunos fragmentos del mismo tamaño. El elevado número de clones distintos, podía deberse, sin embargo, a que la sonda que empleamos llevaba la *homeobox*, y era probable que muchos de estos clones no llevaran secuencias homólogas a *zen*.

Para identificar aquellos clones que realmente poseían las secuencias de nuestro interés realizamos una transferencia bidireccional del DNA de los bacteriófagos digerido con *EcoRI* a unos filtros de nylon mediante la técnica de *Southern blot*. Uno de los filtros lo hibridamos con la sonda del gen *zen* y el otro con una sonda que llevaba la secuencia del gen *bicoid* (C56.46.6), cedida por Thomas Kaufman (Berleth *et al.*, 1988). Los genes *zerknüllt* y *bicoid* se encuentran muy cercanos en el complejo Antennapedia de *D.melanogaster* (menos de dos kb), por lo que los clones de nuestro interés serían los únicos que hibridarían con ambas sondas. Sólo 3 de los 25 clones hibridaban con ambas sondas:  $\lambda$ DsN1 (que resultó estar contaminado por otro clon),  $\lambda$ DsU1 y  $\lambda$ DsW1; por otro lado uno de los clones,  $\lambda$ DsQ2, hibridaba fuertemente con la sonda *zen*, pero no con la de *bcd*, sin embargo dada la diferencia de intensidad de la señal de ese clon respecto a todos los demás, lo consideramos inicialmente como positivo (Figura 10B).

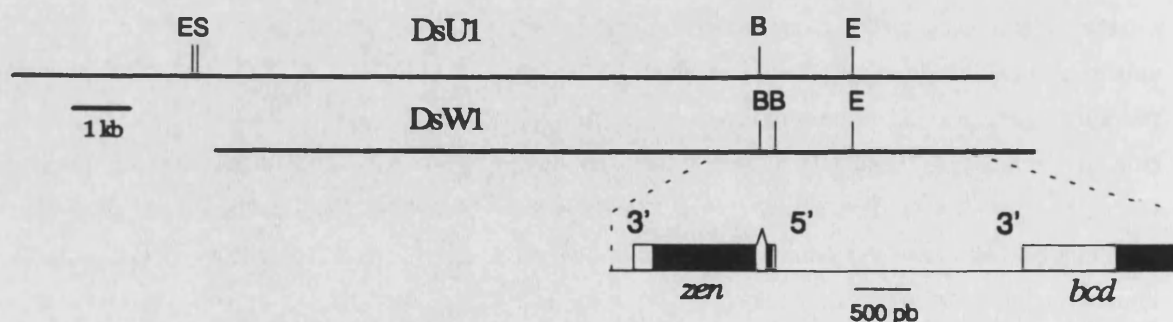
#### 4.2. ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE LOS CLONES DEL BACTERIÓFAGO $\lambda$ OBTENIDOS

Los 3 clones que decidimos analizar,  $\lambda$ DsU1,  $\lambda$ DsW1 y  $\lambda$ DsQ2, presentaban fragmentos *Eco*RI de diferente tamaño, incluidos los que poseían las secuencias homólogas a *zen* identificadas mediante hibridación. Para conseguir una mejor caracterización de los 3 clones, realizamos un análisis de restricción empleando las enzimas *Bam*HI y *Sal*I (sección 11 de Materiales y Métodos). Durante la elaboración del mismo comprobamos que solamente los clones  $\lambda$ DsU1 y  $\lambda$ DsW1 presentaban fragmentos de DNA del mismo tamaño, mientras que  $\lambda$ DsQ2 no tenía ningún fragmento común con los anteriores, por lo que finalmente decidimos descartarlo.

En la figura 11 presentamos el mapa de restricción de los clones  $\lambda$ DsU1 y  $\lambda$ DsW1. Ambos poseen un fragmento *Eco*RI-*Bam*HI de 1.62 kb que da la máxima intensidad al hibridar con la sonda pDmzen, además aparece un segundo fragmento *Eco*RI-*Bam*HI de 9.4 kb en  $\lambda$ DsU1, que es de 8.7 kb en  $\lambda$ DsW1, que presentan una señal de hibridación más débil, por lo que deben poseer alguna secuencia homóloga a *zen* de menor tamaño.

En las hibridaciones con la sonda c53.46.6, con un cDNA de *bcd*, la señal aparece en un fragmento *Eco*RI de 3.2 kb en  $\lambda$ DsW1 y de 2.2 kb en  $\lambda$ DsU1, por lo que ambos han de situarse en la misma posición en el mapa. Ésta, es contigua a la del fragmento *Eco*RI-*Bam*HI de 1.62 kb que hibrida con la sonda pDmzen. Esto significaba que los genes homólogos a *bicoid* y *zerknüllt* se encuentran juntos en *D. subobscura*, conservando su posición relativa respecto a la que ocupan en *D. melanogaster*, aunque todavía no se podía determinar si la orientación también se había conservado.

Hay que destacar que el clon  $\lambda$ DsW1 posee un fragmento *Bam*HI que no está presente en  $\lambda$ DsU1, y que esto posiblemente se debe a que la genoteca no se realizó a partir de una cepa isogénica, por lo que se puede detectar algún polimorfismo. Este hecho podría explicar el que  $\lambda$ DsQ1, a pesar de dar una intensa señal de hibridación con la sonda *zen*, no presente ningún fragmento de restricción común con los restantes clones.



**Figura. 11.-** Mapa de restricción de los clones  $\lambda$ DsW1 y  $\lambda$ DsU1. En la parte inferior se muestra ampliada la estructura de la región secuenciada. E= *Eco*RI; B= *Bam*HI; S= *Sal*I. Los rectángulos negros representan las secuencias codificantes, los blancos las secuencias no traducidas.

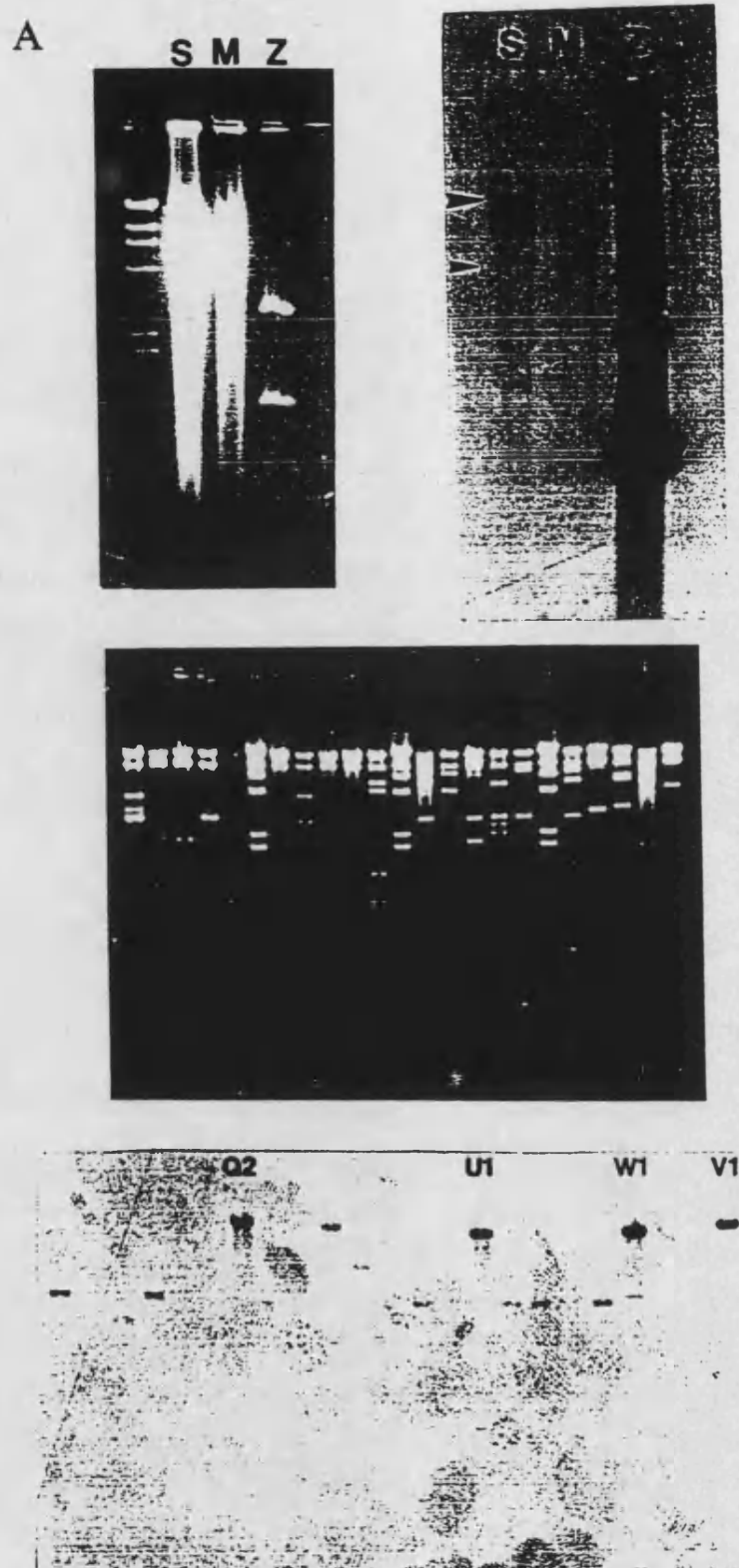


Figura 10. A) Identificación de secuencias homólogas al gen *zerknüllt* en *D.subobscura* (S) sobre DNA genómico digerido con *EcoRI*. Como control positivo se usó DNA de *D.melanogaster*. Las flechas indican las bandas correspondientes a las secuencias que hibridan con *zen*. B) ADN de los clones obtenidos en el rastreo de la librería de *D.subobscura* digerido con *EcoRI*. En la parte inferior se muestra el filtro hibridado con la sonda pDmzen, usada en el rastreo. Se aprecia cómo los clones  $\lambda$ DsW1,  $\lambda$ DsU1,  $\lambda$ DsQ2 y  $\lambda$ DsV1, son los que dan mayor señal de hibridación.

### 4.3. DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA DEL GEN *zerknüllt* DE *Drosophila subobscura*

Inicialmente, decidimos comenzar la secuenciación del fragmento *EcoRI-BamHI* de 1.6 kb, ya que éste presentaba la mayor intensidad de hibridación con pDmzen. Para ello lo subclonamos en un plásmido PUC18, al que denominamos pDsW1.13, y llevamos a cabo una reacción de secuenciación por el método de Sanger por ambos extremos del fragmento (ver sec. 13 de Materiales y Métodos), comprobando que la secuencia obtenida era homóloga a la del gen *zerknüllt* de *D.melanogaster*.

Tras esta confirmación procedimos a secuenciar el clon pDsW1.13 por completo, aplicando la técnica de delecciones seriadas (Materiales y Métodos, sección 12). Para obtener la secuencia de la cadena complementaria subclonamos el fragmento *EcoRI-BamHI* en PUC19 (denominamos al clon pDsW1.27) y utilizamos de nuevo la técnica de delecciones seriadas. Al comparar la secuencia obtenida con la de *D.melanogaster* comprobamos que parte de esta, aproximadamente los 700 pb finales, eran homólogos a la región 5' del gen *zerknüllt*, cubriendo aproximadamente la mitad del mismo.

Fue necesario subclonar los fragmentos *BamHI* y *EcoRI-BamHI*, de 250 pb y 9,4 kb respectivamente, del clon  $\lambda$ DsW1, en PUC18 y proceder a su secuenciación para completar la secuencia del gen *zerknüllt* de *D.subobscura*. En el caso del fragmento *EcoRI-BamHI* de 9 kb, cuyo plásmido se denominó pDsW1.5, se emplearon como *primers* oligonucleótidos diseñados específicamente para cada reacción (ver figura 12), este fragmento de 700 pb contenía secuencias homólogas a la región 3' del gen *zerknüllt*, que incluía la última porción de la secuencia codificante y el *trailer* no traducido, hasta llegar más allá de la señal de poliadenilación.

Tras secuenciar los clones anteriores disponíamos de la secuencias homólogas al gen *zerknüllt*, incluyendo parte de la posible región promotora del mismo (unos 900 pb). El promotor descrito en *D.melanogaster* tiene un tamaño de 1.6 Kb, y puesto que un objetivo marcado era realizar la comparación de esta región en ambas especies, consideramos necesario extender la secuenciación de *D. subobscura* hasta el extremo 3' del homólogo de *bcd*, que ya habíamos detectado mediante hibridación en un fragmento *EcoRI* de 3 kb. De esta manera, aunque desconocíamos el tamaño de la región promotora del homólogo de *zen* en *D. subobscura*, tendríamos la seguridad de recoger todas las posibles secuencias reguladoras del gen en esta especie. Subclonamos este fragmento *EcoRI* de 3 kb en PUC18 e identificamos dos clones en los que el inserto estaba en las dos orientaciones posibles mediante digestión con la enzima *PstI*: pDsW1.35 y 38. Realizamos unas reacciones de secuenciación en los extremos del inserto y determinamos así que uno de los extremos presentaba homología con el exón 3 del gen *bcd* de *D.melanogaster*, por lo tanto, el otro extremo debería ser el más próximo al gen homólogo a *zen*.

Decidimos entonces aplicar la técnica de delecciones seriadas sobre ese extremo, con la esperanza alcanzar la región homóloga a la 3' del gen *bcd*. En total secuenciamos unas 2 Kb de los clones pDsW1.35 y pDsW1.38, para que la lectura fuera de doble cadena, y por comparación con *D.melanogaster* pudimos identificar secuencias homólogas a las del extremo 3' del gen *bcd* de *D.melanogaster*. De este modo, habíamos conseguido secuenciar la región intergénica entre los genes *bcd* y *zen* de *D.subobscura*.

En la figura 12 presentamos la región completa secuenciada en *D. D.subobscura*. Indicamos en ella los diferentes clones utilizados, así como los oligonucleótidos empleados como *primers* en algunas reacciones. También se muestran las secuencias codificantes encontradas, con la correspondiente traducción a aminoácidos, y otros elementos de interés de la secuencia.

#### 4.4. ANALISIS COMPARATIVO DE LAS SECUENCIAS

Tras completar la secuenciación de la región iniciamos el estudio comparativo de las secuencias obtenidas. Aplicamos en primer lugar el programa COMPARE del paquete GCG, cuyo resultado es visible realizando un DOTPLOT. La comparación de nuestra secuencia con la de los genes *bcd* y *zen* de *D.melanogaster*, incluida la región intergénica, nos permite comprobar que la organización de esta región es casi idéntica en ambas especies. Ambos genes son contiguos, están separados por una distancia similar, 1.65 Kb en *D.melanogaster* y 1.9 Kb en *D.subobscura*, y la orientación 5'-3' de los mismos también se ha conservado (Figura 13).

En las 4.47 Kb secuenciadas en *D.subobscura* aparece completa la secuencia del homólogo del gen *zerknüllt* de *D.melanogaster* y el final del homólogo del gen *bcd*, que comprende el último exón de este gen y su región 3' no traducida. La región existente entre ambas secuencias codificantes debe contener, tal y como ocurre en *D.melanogaster*, los elementos reguladores del *zen* de *D.subobscura*.

##### 4.4.1. COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS HOMÓLOGAS AL GEN *zerknüllt*

###### 4.4.1.1. ORGANIZACIÓN DE LA UNIDAD DE TRANSCRIPCIÓN

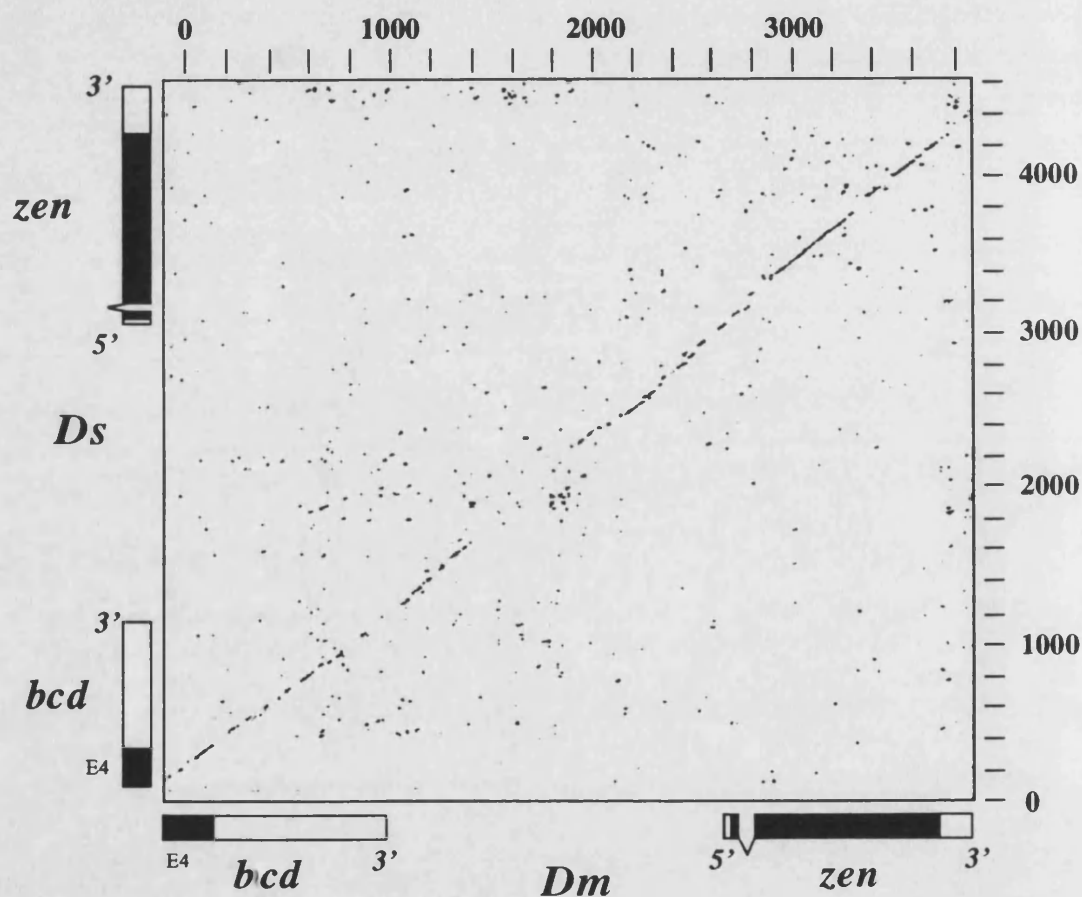
En la figura Y se muestra la comparación de la unidad de transcripción del gen *zerknüllt* de *D.melanogaster* con su homólogo en *D.subobscura*. La similitud detectada considerando en conjunto las diferentes regiones del gen es de un 78%, aunque pueden distinguirse una partes más conservadas que otras. La organización de la unidad de transcripción es casi idéntica en ambas especies, aunque la de *D.subobscura*, debido a la existencia de numerosas inserciones es 131 pb más larga que la de *D.melanogaster*. Consideraremos siempre, a efectos prácticos, a *D.melanogaster* como especie de referencia, de manera que las inserciones serán una ganancia de bases y las delecciones la pérdida de las mismas en *D.subobscura*, sin que ello suponga por nuestra parte ninguna valoración respecto a la pérdida o ganancia real de bases de una especie respecto de la otra.

← I3 → AsnLeuGluProLeuLysSerHisThrValValGlyLeuAspLysSerCysAspAspGlySerSerAspAspMetS  
 TTCTTCTTCATTCGCCCATACAGAACCTGGAGCCGCTGAAGAGCCATACGGTTGTTGGTCTAGACAAAAGCTGTGACGATGGCAGCAGCGATGATATGA 100 *b*  
 E4  
 erThrGlyMetArgValLeuSerGlyArgGlyAlaPheAlaLysPheGlyLysProSerAlaAlaGlnAlaGlnProGlnProProProProLeuG 200 *c*  
 GCACTGGCATGCGGCTGCTGCGGTGCGGAGCCTTTGCCAAATTTGGCAAGCCATCGGCCGCCAGGCCACCAACCACGCCGCCCGCCATTGGG *d*  
 yMetMetHisAspThrAsnGlnTyrGlnCysThrMetAspThrIleMetGlnAlaTyrAsnProHisArgAsnAlaGlyGlyAsnThrGlnPheAlaTyr  
 GATGATGCATGACACGAACCAATATCAATGTACGATGGATACGATAATGCAAGCGTATAATCCGCATCGTAATGCCGAGGCAACACACAGTTTGCTTAC 300  
 O8  
 CysPheAsnFin  
 TGCTTCACTAGTAGCAGCCTAGCGGGGAGACTTAGACTAGAACTTAGGCCTAAGCGATAAACAATATCTTTTGTTCCTGATTGTACAAATACCATT 400  
 TGATTGTAGATATCTGCGCGTAGTTATGTGTAAAGCCTCAATGTAAATTTGTTCTTAGTCTTTTATGTACTAGCCTAGTCAGCAGCGCGAGATTTTAA 500  
 TCAAACTTCAAGTGATATTGCTCTTACCTCTGCTTATCGAAAACTTCTCTGCCATGCGTTGCTTGGTTTGGTTGGTGGACATTCCTCCC 600  
 AAAAGCCCGAGAAATGCTGCTAAATCAATCGAGGTGTTTATGGGCTTGACGCATGCCGAGAAAGTTATTTTCCCTCATTTTAAGCAAAGGAATC 700  
 CCCTGGCTCTGATACAAATTTGTATAGCTAAACCTGTCTAATCGAAATGCAAAATGTTTCTCTGGCGTAATCATATAACAATGTTTATATAAT 800  
 TACCATCTAAAGATTGAACATTTAAACAACCTCAGAATATGCTATGACAAAGCGTTGGCTTGTGCGACATTTGGACATTTCTTCTGCAAGAAATGTCAGCA 900  
 AATCGTCTGCCGAAACAGCCAAACATTTGTTCTGCTCGGATTCCTTTACTGATTTATTTATATACCCATTATTATTTTAAGATCGTCTTTAATAT 1000  
 CACTTCAAGTTCGATTGAAACCTGTTTAGCTTCGATTGTAGTGTAAAGTTCCTCGGTGCACCATGTGTCATGTTTACTCTTTTATAAGCTTTTGTGT 1100  
 GTAATCTTTGGGAATATATAAACAACATATGAGCTATGCTTCCCAAAATGTTGCCACTAGGCATGTGCGAGTATGCTTAAAAATCTTCTCAACGAAA 1200  
 AAAAGTATGTTTTCGAAATCTTATGAATTTAAATGTACTTTTATGTTGCCCGGTTGTTGTTCCACCCCGCACACACATGCGTGTGCTAAAAAT 1300  
 GTGATTGCGGATGTTTCTACGAAACCCGCGAGTCGTCT *poliA* AAAATA TTTGGCACCACCAGCTGCCCGTGTATATAGTTACCTGATCTGCGCTCCTATC 1400  
 CCACACGACCCCGACCTCGCCCGGCTGCGTGTGTGCACCACTTAGGTAGGCAGTGTACAGGCTGACAGTGGCGGCCCGCTGTTTAGCAGGCCCACTTG 1500  
 TACTTGTGCTCAATTTTCTTTGATATAAATATGGAATAATCCAGAAACCAAAACGCTCTCTTACATGAACGAATCTCGATTGGAATTTCCAGTGT 1600  
 TCCCAATTTTATTTGAAGCCCAACAAATGGCGCGTCACTCTCAACGGTGGATTATTCGTTGTGTTTTCAGGGGAAATTCCTAAAGGAAGATGAATGT 1700  
 TTTTAGAGCATAATCTAATGGTAATGTATGCTGATTAATTTTATAAAATGCAATTTTATGTTGTATGATATGGAACCTAAAGGAAACA 1800  
 AATTTCTTTAATTTTGAACCTTAAAGAAATTTTATGATATTATCATAGAGTTATTTATGATTTTGTATATATCTGAACAATCCAGATCATGGATC 1900  
 TCTATTTACATATATTTTATGATATTTTCCATTTTCCATTAAACCATTTAGAATTTTAAAGTAAATTTAAATTTAAGCTGATTCAAGACTATTAAATC 2000  
 TCTTGGCTGCTTGGCGTATTCAACCTCCTTTCTATAGACTTATTTTAGTACATGTTTCTTTAAGATATGTTTAAATGCTTGCAGAAATTTCCG 2100  
 TTCTCCTTTCTTGCAGAAATTTTACCAATAACATTTAAGATCTACGCTCCAAACCTTAGCGACTCTCTGCAAAATAATTGATGCCAATGTTCTCGATTAA 2200  
 TATTATTACTTCAACTTAAGATTTCCCGCACTCACTGTACCACAGATGCCCTACAATTTCCCTGTTATGACTTCTCTTTGTTTGTGCATATTTTATG 2300  
 CGACTTCTTAGAAGGAGCAATCCGATAGCGCCAGTAATAAATATTTGGCAAGTCCGAGGATCGAAGGACCGGACAGATTCGCATATTCACAGTAGA 2400  
 CAGGGATAGAGTCTGAGGCTTCTGCTGTGAGAGAGTCATAAACTCCCGAGGAGTATCCTTTTTCGAGCGTGTCTTTCATGCAATTATGAGGATAAT 2500  
 GTGGGACGATGCTAGCGACCAAAAGCCGACATGACACAGGACAGAGCGGCACATCGGTTTCACTTTTCAGCGGAGCTCGACTCTTCTCAACAGGTGC 2600  
 TACATGTTGGACAACGTAGATCAGAGTTCTCTTTGGTTTGTAGATCATCATCAGGCATTGGCCAAGACGACGACGACAGGACTGTCTACCTGGCTAG 2700  
 ACTCTGGCCGCGACCCCGTGGCAGTGTGTCTCACGTAATGCCAAATCCTTGGTTGGATTTCGATCAAAACAAGCCCTAGATTGGCCATTCCGAGGACT 2800  
 CCTTTCCGACTAGAACTCAGACTCGAAGGACTTGGCTAGTCTGTCTGGTCCAAATGGCGGTGCGACGCGCTCGAGTGCAGAGAGGAAGGCCAAAAGG 2900  
 GGATTTATGACTCGCGGTTTAGGCAAAATTTTTCGCAACGACGCAACGCCCTGACCTGAAATGTTGACCGATCTCTACCTAGGCGTAGAGCTCT 3000  
 TATA box  
 AATAAAGAGAGAATGTTTGGTTAGGGCAGCATATCATCTACTCTGGACAGTCCCGTGTGCAACATCAGCAGCCAAAAACCTCGAAGATCATGTCTATGT 3100 MetS  
 erSerValMetHisTyrTyrProValHisHisProThrAlaProProValValLysTyrSerAsp ← INTRON  
 CATCCGTCATGCATTACTATCCAGTGCATCATCAACAGCGCCGCGAGTGGTTAAATACAGCGATGTAAGTGCCGAAAAACCTTTCCAAATAAAGGATT 3200  
 → LeuLeuTyrGlyHisHisHisSerAlaAsnLeuGlnProThrSerLeuGlnAsnTyrThrGlnHisSe  
 TAACTAATTTTGTAGTTTTCCTTTCCTTCTAGTGTCTTATGGACATCATCATTCGCGAATCTGCAGCGGACTTCCCTGCAGAACTACACGAGCAGCAG 3300  
 rValSerSerIleProGluHisProSerLeuGlnGlnHisHisHisGlnHisHisGlnGlnGlnGlnLeuSerSerAspGluAsnLeuProSerGlnPro 3400 *z*  
 TGTCAGCAGCATACAGAGCATCTTCTGTTGAGCAGCATCATCATCAACACCATCAGCAGCAGCAGCTCTCTCGATGAGAATCTGCCCTCGCAGCCC *e*  
 SerGlnAspMetGlnArgValLysLeuLysArgSerArgThrAlaPheThrSerValGlnLeuValGluLeuGluAsnGluPheLysSerAsnMetTyrL 3500 *n*  
 AGCCAGGATATGCAGCGAGTGAAGCTGAAGCGTTCCAGGACGGCTTTACCAGCGTCCAACCTGGTGGAGCTGGAGAACGAGTTCAAGAGCAACATGTACC  
 euTyrArgThrArgArgIleGluIleAlaGlnArgLeuSerLeuCysGluArgGlnValLysIleTrpPheGlnAsnArgArgMetLysPheLysLysAs 3600  
 TCTATCGGACACGACGATCGAGATAGCCAGCGGCTGCTCTGTGCGAGCGACAGGTGAAGATTGGTTCCAGAATCGACGGATGAAGTTCAAGAAGGA  
 pIleGlnGlyHisArgGluAlaLysAlaSerAlaLysLeuAlaGlnProGlnAlaGluGlnSerAlaHisArgGlyIleValGlnArgLeuMetSerTyr 3700  
 CATCCAGGGCCACCGGAGGCCAAGCGAGTGAAGCTCGCTCAGCCCCAGCGGAGCAGAGTCCCATCGGGCATAGTGCAGCGACTGATGTCTTAC

C 4701

**Figura 12.** Secuencia completa de la región analizada en *D.subobscura*. La región homóloga al gen *bicoid* incluye el exón 4, del que se ofrece su traducción a proteína, y la región 3' no traducida hasta la señal de poliadenilación. El resto de la secuencia corresponde al gen *zerknüllt* de *D.subobscura*, incluyendo el promotor, la región codificante (con su traducción a proteína) y la región 3' no traducida. La numeración de las bases se ha establecido arbitrariamente a partir del primer nucleótido secuenciado. Se indica la presencia de los sitios de restricción *Eco*RI y *Bam*HI, así como los diferentes clones empleados en la secuenciación: pDsW1.5, pDsW.13, pDsW1.28 y pDsU1.3. Las secuencias subrayadas corresponden a los oligonucleótidos empleados como cebadores en determinadas reacciones de secuenciación.





**Figura 13.-** DOTPLOT de las secuencia completa obtenida en *D.subobscura* (*Ds*) frente a *D.melanogaster* (*Dm*). Puede observarse que la región secuenciada en *D.subobscura* comprende el final del gen *bicoid*, el gen *zerknüllt* y la región no codificante existente entre ambos. En esta última también existen secuencias conservadas, que corresponden a los elementos reguladores de *zen*.

La *homeobox* es la región mejor conservada en ambas especies con una similitud del 85%. Puesto que esta proteína tiene una función reguladora, el poseer un dominio funcional de unión al DNA es fundamental, lo que podría explicar una conservación semejante. Otras regiones bien conservadas aparecen antes y después de la *homeobox* y hacia el final de esta región entre las bases 838 y 934 y 1009 y 1069 de *D.melanogaster*, por lo que pueden tener una función relevante.

Hemos calculado, mediante el programa CODONFREQUENCY, el uso de codones en ambas especies, y hemos intentado determinar si existe alguna preferencia por el uso de determinadas bases en la tercera posición de los mismos. Para ello hemos estimado para cada aminoácido el número de codones que tenían G o C y los que tenían A o T en la 3ª posición en ambas especies, normalizando respecto a uno. Los resultados los ofrecemos en la siguiente tabla, en la que hemos señalado en negrita una mayor preferencia por G o C en la tercera posición.

aa	G+C 3ª base	
	<i>Dm</i>	<i>Ds</i>
Gly	<b>0.6</b>	<b>0.87</b>
Glu	<b>0.75</b>	<b>0.87</b>
Asp	0.41	0.25
Val	<b>0.71</b>	<b>0.88</b>
Ala	0.42	<b>0.58</b>
Arg	<b>0.8</b>	<b>0.7</b>
Ser (AGX)	<b>0.67</b>	<b>0.68</b>
Lys	<b>0.81</b>	<b>0.88</b>
Asn	<b>0.77</b>	0.56
Ile	<b>0.8</b>	<b>0.84</b>
Thr	0.55	0.21
Cys	<b>1</b>	0.5
Tyr	0.57	0.54
Leu (TTX)	<b>0.86</b>	<b>0.95</b>
Phe	<b>1</b>	<b>0.8</b>
Ser (TCX)	<b>0.67</b>	<b>0.9</b>
Arg	0.54	0.46
Gln	<b>0.73</b>	<b>0.84</b>
His	0.53	0.25
Leu (CTX)	<b>0.86</b>	<b>0.95</b>
Pro	0.54	0.48

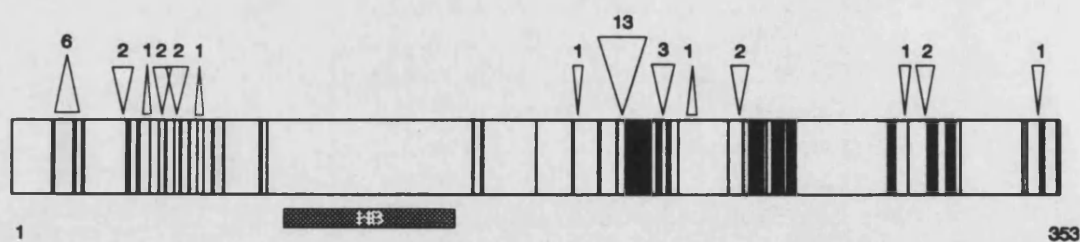
No podemos apreciar ninguna tendencia diferencial entre las dos especies, aunque en ambas parece existir preferencia por G o C en la tercera posición. En *D.melanogaster* 14 aa muestran preferencia por codones terminados en G o C, mientras que en *D.subobscura* esto ocurre en 13 ocasiones; así, la fracción total de codones que terminan con estas bases es 0.694 en *D.melanogaster* y 0.666 en *D.subobscura*, por lo que no parece existir una desviación significativa en ninguna de las dos especies.

#### 4.4.1.3. SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

A partir de la secuencia codificante determinada anteriormente establecimos la secuencia teórica de aminoácidos de la proteína *zen* de *D.subobscura*, aplicando para ello el programa TRANSLATE del GCG. En la figura 15 mostramos el alineamiento de las secuencias de la proteína *zen* de *D.melanogaster* y *D.subobscura*. El producto *zen* de *D.subobscura* tiene 20 aminoácidos más que *D.melanogaster*, resultado de las numerosas inserciones que hemos comentado anteriormente en la comparación de la secuencia de DNA. Podemos destacar una inserción de 13 aminoácidos en el punto 204 de la proteína de *D.subobscura*, mientras que las restantes son de 1 a 3 aminoácidos.

La identidad de secuencia es del 74% y la similitud es del 82%. Sin embargo la variabilidad no se reparte por igual a lo largo de toda la proteína, existiendo regiones muy conservadas frente a otras que presentan mayores variaciones. Esto es apreciable en la representación de Kassis del alineamiento protéico (Figura 15), en la que se indican los cambios de aminoácidos ocurridos en *D.subobscura* (barras negras) así como la inserciones y deleciones que han sucedido respecto a *melanogaster* (triángulos de la parte superior), hemos considerado conservativos los cambios V-A-L-I, E-D y S-T (Kassis *et al.*, 1987).

El hecho más significativo que encontramos es la extraordinaria conservación de la *homeobox*, que es idéntica en ambas especies y da idea de la importancia de este motivo de unión al DNA en la función de esta proteína. En las regiones adyacentes a este motivo se han producido algunos cambios que podrían ser determinantes sobre la especificidad de la proteína sobre sus secuencias diana.



**Figura 15.-** Representación de Kassis de la secuencia proteica codificada por el gen *zerknüllt*. El rectángulo representa la secuencia de aminoácidos de *D.melanogaster* (353), cada línea vertical indica un cambio en la identidad de un aminoácidos en la secuencia de *D.subobscura*; los triángulos indican las inserciones y deleciones respecto a *D.melanogaster*, la punta hacia abajo indica que en *D.subobscura* se ha producido una inserción, hacia arriba indica una deleción, en ambos casos la cifra de la parte superior del triángulo señala el número de aminoácidos. Se han considerado cambios sinónimos: V-A-L-I, E, S-T.

```

Dm MSSVMHYYPVHQAKVGSYSADPSEVKYSDLIYGHHH DVNPIGLPPNYNQ MNSNP 54
Ds -----HP TA-PV-----L-----SANLQ-TS- Q--T-HSVS-I-EH 53

                                . HOMEEO .
TTLNDHCSPQHVHQHVSSDENLPSQPNHDSQRVKLKRSRTAFTSVQLVELENEFKSNMY 114
PS-QQ-H H--HQ--QL-----SQ-M----- 112

BOX
LYRTRRIEIAQRLSLCERQVKIWFQNRMKFKKDIQGHREPKSNAKLQPOAEQSAHRGI 174
-----A-AS----- 172

VKRLMSYSQDPREGTA AAEKRPMMAVAPVNP KPDYQASQKMKTEA 219
-Q-----AA-S-----AV-A--AA-VVAAPPVAAATSTASFYQQA-I-PQ-I 232

STNNGMCSSADLSEILEHLAQTAAPO VSTATSSTGTSTNSASSSSSGHYSYNVDL 275
PSNN--S-----S--V-AAT-TPPGP-V-PTCG-TGV----- 291

VLQSIKQDLEAAAQAWSKSKSAPILA TQSWHPS SQSQVPTSVHAAPSMNLSWGEPAA 332
-----AG-V--NA-----GVGS-S--AVS--T----- 351

KSRKLSVNHMNPVCV TSYNYPN. 353
-----IS-I---AGG---Q-- 373

```

**Figura 16.-** Comparación de la secuencia proteica codificada por el gen *zerknüllt* de *D.melanogaster* (Dm, secuencia superior) y *D.subobscura* (Ds, secuencia inferior). Los espacios en blanco representan inserciones o deleciones, los guiones indican aminoácidos comunes. Se señala la presencia de la *homeobox* (recuadro) y de las secuencias PEST identificadas (en gris). La similitud entre las dos especies es del 85%. El alineamiento se realizó con el programa GAP del GCG.

En el resto de la proteína se alternan regiones conservadas frente a regiones variables, en la que se acumulan inserciones y cambios de aminoácidos. El fragmento mejor conservado después de la *homeobox* se encuentra a partir de la posición 264 de *D.melanogaster* con 31 aminoácidos contiguos idénticos. En cuanto a las regiones variables, podemos apreciar que la mayoría de ellas se deben a inserciones producidas en *D.subobscura* que, como ya vimos en el alineamiento de la secuencia de DNA, además de aportar aminoácidos adicionales provocan la pérdida de la pauta de lectura, por lo que a la mayoría de estas inserciones les siguen numerosos cambios en la identidad de los aminoácidos. Hechos de este tipo ocurren en los puntos 30, 44, 51, 204, 261, 325 y 366 de la secuencia de *D.subobscura*.

Hemos intentado identificar en ambas especies la existencia de secuencias PEST, que son características de las proteínas de vida corta y que Kaufman *et al.* (1990) señalan en su análisis del gen *zerknüllt*. Estas secuencias se caracterizan por ser ricas en los aminoácidos prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T), que se encuentran juntos en unos dominios con aminoácidos positivos marcando los extremos y con la presencia de numerosos aminoácidos de carga negativa formando grupos (Rogers *et al.*, 1986). Hemos identificado como posibles secuencias PEST las siguientes:

Dm 160 K L A Q P Q A E Q S A H  
Ds 157 + & & - P - & - - O & +

Dm 174 R L M S Y S Q D P R  
Ds 173 + & & O & O - - P +

Dm 216 K T E A S T N N G M C S S A D L S E I L E H  
+ O - & O O - - & & & O O & - & O - & & - +  
Ds 226 K P Q A I P S N N N N S M C S S D L S E I L E H  
+ P - & & P O - - - O & & O O - & O - & & - +

Donde:

+ Aminoácido de carga positiva  
- Aminoácido de carga negativa  
O Serina o Treonina  
P Prolina  
& Cualquier otro aminoácido

#### 4.4.1.4. REGIÓN PROMOTORA

En la figura 17 presentamos el alineamiento de la región existente entre los genes *bcd* y *zen*, desde la señal de poliadenilación del primero a la caja TATA del último. La secuencia de *D.melanogaster* sólo ha sido publicada parcialmente, el resto ha sido obtenida por comunicación personal del Dr. Michael Levine. Esta región constituye el promotor del gen *zerknüllt* en *D.melanogaster*, y por la homología obtenida parece ser también el de su homólogo en *D. D.subobscura*. El promotor comprende 1600 pb en *melanogaster* y 1900 pb en *D.subobscura*.

El alineamiento de ambas secuencias aparece como el típico de secuencias no codificantes, con numerosas inserciones, deleciones y sustituciones nucleotídicas, y con pequeñas regiones conservadas aisladas entre zonas muy variables. Y sin embargo, la similitud obtenida para la zona en su conjunto es del 72%, por lo que se4 puede considerar significativa. Esta conservación indica que en la secuencia existen elementos que deben ser fundamentales para la regulación del gen.

En la figura 18 presentamos el gráfico DOTPLOT obtenido a partir del programa COMPARE del paquete GCG. Ésta nos permite apreciar claramente la existencia de 2 zonas más conservadas en los extremos y otra central que no muestra similitud alguna. Las zonas de mayor conservación comprenden los nucleótidos -1200 a -1600 y -100 a -700 en *D.melanogaster* y sus equivalentes en *D.subobscura* se extienden desde -1400 a -1800 y de -100 a -800. Mediante experiencias de transformación Doyle *et al.* (1989) habían identificado en *D.melanogaster* unas secuencias necesarias para la regulación de *zen*, situadas en las posiciones en las que existe mayor conservación. La región distal del promotor se extendía desde -1400 a -1600 y era la responsable de la represión ventral del gen; la comparación entre las dos especies indicaría que esta región es mayor, abarcando en *melanogaster* desde -1200 a -1600, y en ella se encuentran, como veremos luego, los sitios de unión de las proteínas que reprimen la expresión del *zerknüllt*. La región proximal del promotor era la responsable de la activación dorsal del gen, así como de su posterior modulación y se extendía hasta la posición -660; la comparación entre las dos especies confirmaría la existencia de este dominio, en el que existen secuencias muy conservadas que podrían ser diana de proteínas específicas, la longitud de esta región se aproxima mucho a la indicada por Doyle: de -100 a -700 pb.

La región distal del promotor ha sido analizada recientemente por Kirov *et al.* (1993) en las especies *D.melanogaster*, *D.virilis*, *D.pseudoobscura*, por lo que podemos comparar la secuencia de *D.subobscura* frente a todas ellas, lo que presentamos un alineamiento múltiple de la figura 19. Podemos observar que en las 4 especies existen secuencias muy bien conservadas, algunas de las cuales pueden tener funciones reguladoras.

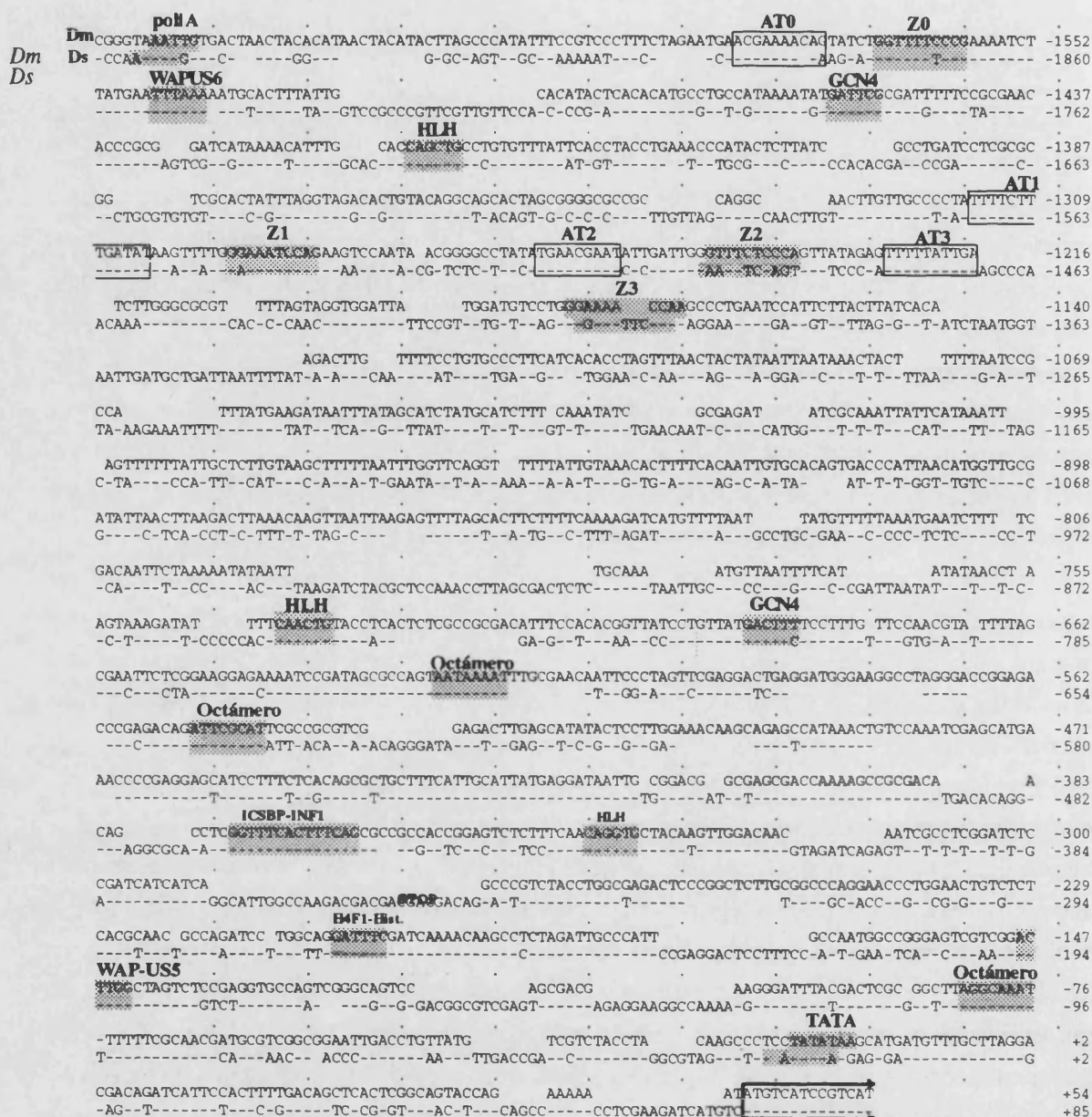
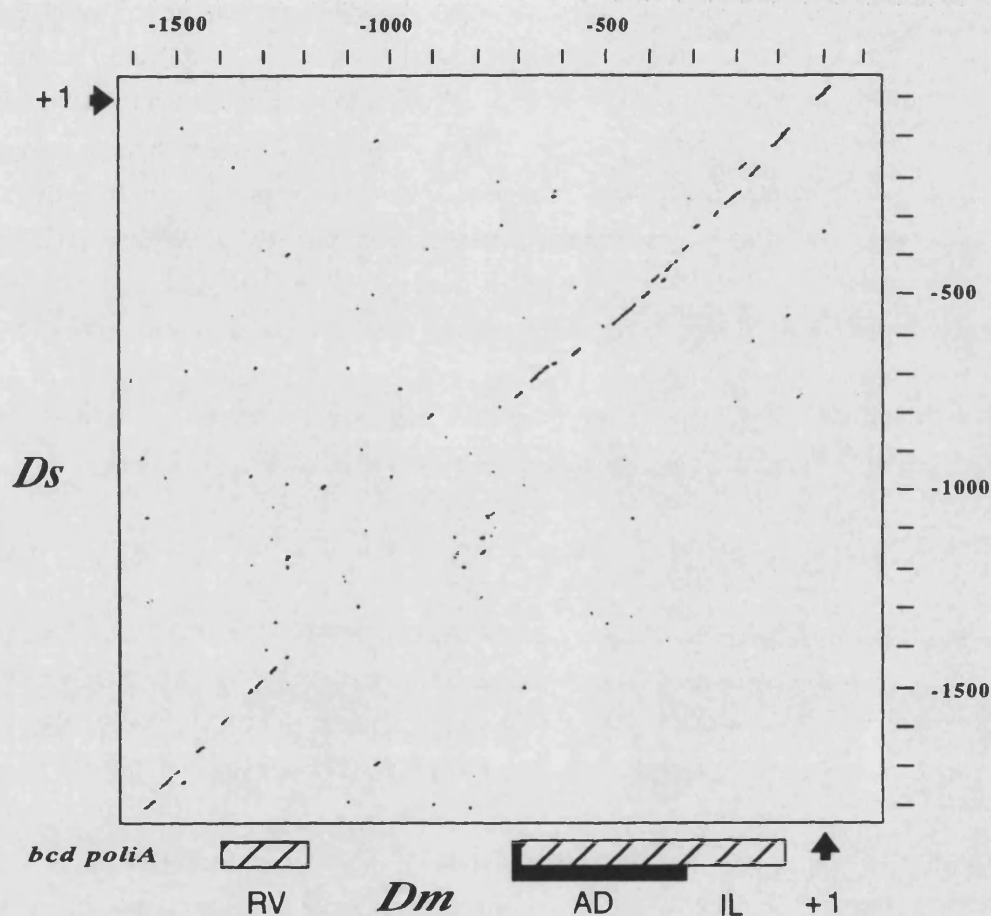


Figura 17.- Comparación de la región promotora del gen *zerknüllt* de *D. melanogaster* y *D. subobscura* realizada con el programa GAP. La región comparada comprende desde la señal de poliadenilación del gen *bicoid* hasta el punto +1 de *zerknüllt*. Las secuencias se han numerado desde el punto +1 de *D. melanogaster*. Se han señalado todos los elementos de interés, indicándose el nombre de los factores que podrían unirse a las secuencias recuadradas. Z0 a Z3, dianas de *dorsal*, AT0 a AT3, zonas ricas en AT; HLH secuencias de unión de proteínas de la familia hélice, lazo, hélice;





**Figura 18.-** DOTPLOT de la región promotora del gen *zerknüllt* de *D. subobscura* (*Ds*) frente a la región homóloga de *D. melanogaster* (*Dm*). En esta última se han representado las diferentes regiones reguladoras descritas por Doyle *et al.* (1989): RV=represión ventral; AD=activación dorsal; IL=inhibición lateral.



La unión de la proteína *dorsal* en diferentes puntos de esta región ha sido estudiada exhaustivamente en *D.melanogaster* por Ip *et al.* (1991). Estos autores identificaron 4 secuencias necesarias para la unión de la proteína *dorsal*, pues al ser alteradas la unión no se producía. Las 4 secuencias respondían al consenso de unión de la familia NFκB, a la que pertenece la proteína codificada por *dorsal*: GGGR C/A/T TYYCC (Y= C o T).

Kirov *et al.*(1993), al comparar esta región en las especies que hemos mencionado, encontraron que dos de estos sitios (identificados como Z0 y Z1) estaban conservados, aunque con un cambio en la secuencia en *D.pseudoobscura*: la 3ª G del consenso era A en esta especie; este hecho también ocurre en *D.subobscura*, que posee estos 2 sitios en la misma posición con el cambio G por A. El tercer sitio de unión (Z3) no se había conservado tan bien como los anteriores, aunque era posible identificar secuencias capaces de unir la proteína *dorsal* en todas las especies; en *D.subobscura* también podemos encontrar un sitio que responde al consenso NFκB (identificado con el programa FINDPATTERNS del GCG) que también es diferente del existente en *D.melanogaster*. El cuarto sitio de unión de *dorsal* identificado por Ip *et al.* (Z3), el menos conservado al no estar presente en *D.virilis*, aparece en *D.subobscura* y en este caso la secuencia es mas parecida al consenso al no presentar cambiada la 3ª G. En todos los casos las secuencias de unión de la proteína *dorsal* en *D.subobscura* y *D.pseudoobscura* resultaron ser idénticas, lo que podría deberse a la proximidad filogenética de ambas especies, que pertenecen al grupo *obscura*.

En el cuadro inferior presentamos todos los sitios que responden al consenso NFκB en las cuatro especies; hemos destacado en negrita las posiciones conservadas en cada uno de ellos:

	GGGR C/A/T TYYCC			
	Z0	Z1	Z2	Z3
<i>D.melanogaster</i>	GGGAAAACCA	GGGAAATCCA	GGGAGAAACC	GGGAAAACCA
<i>D.pseudoobscura</i>	GGAAAAACCA	GGAAAATCCG	GGAATTTCCA	GGGAAATTTTC
<i>D.subobscura</i>	GGAAAAACCA	GGAAAATCCA	GGAATTTCCA	GGGAAATTTTC
<i>D.virilis</i>	GGGAAAACCA	GGAAAATCCA	GGGAGAAACC	----

Los sitios Z0 y Z2 se encuentran situados en la cadena complementaria, por lo que en el alineamiento aparecen invertidos y con las bases complementarias a las que hemos representado en la tabla superior.

Kirov *et al.*(1993) también observaron la presencia de 4 secuencias ricas en AT muy conservadas, que se encontraban próximas a cada una de las dianas de *dl*, y a las que probablemente se unirían las proteínas que colaboran con la proteína *dorsal* en la represión de *zen*. Estas cuatro secuencias, denominadas AT0, 1, 2 y 3, también están presentes en *D.subobscura*, bastante bien conservadas, lo que nos permite establecer una secuencia consenso entre todas las especies para cada sitio y, a partir de éstos, proponer uno general para los 4 sitios:



Ambos genes presentan una caja TATA idéntica, del tipo TATATAA, que está situada a 16 pb del punto +1 en *D.melanogaster*, y a 18 pb del que proponemos, por homología, como sitio +1 en *D.subobscura*. La región codificante se inicia a 52 pb del punto +1 en *melanogaster* y a 78 pb en *D.subobscura*, debido a una inserción de 28 pb. En los dos casos existen dos exones separados por un pequeño intrón; y el segundo exón, en el que se encuentra la *homeobox*, es de mayor tamaño que el primero. Como la secuenciación del gen *zerknüllt* en *D.melanogaster* se hizo a partir de un cDNA, no conocemos la secuencia del intrón, aunque Rushlow *et al.* (1987) indican su situación exacta sobre el gen. Al partir de una genoteca genómica nosotros sí que hemos determinado la secuencia del intrón, por lo que al realizar la comparación entre ambas especies en *D.subobscura* aparece una *inserción* de 66 pb, que corresponde al mencionado intrón. Esta *falsa inserción* aparece situada en la posición que señalan Rushlow *et al.* como los límites del intrón en *melanogaster* (entre +140 y +141), para el que estiman un tamaño de 64 pb.

La secuencia intrónica determinada en *D.subobscura* se extiende 66 pb y los consensos de ambos extremos están bien conservados:

$\delta$										$\delta$					
A <sub>64</sub>	G <sub>73</sub>	G <sub>100</sub>	T <sub>100</sub>	A <sub>62</sub>	A <sub>68</sub>	G <sub>84</sub>	T <sub>63</sub>	...	6Py <sub>74-87</sub>	N	C <sub>65</sub>	A <sub>100</sub>	G <sub>100</sub>	N	
A	T	G	T	A	A	G	T	...	6C	T	T	A	G	T	

En la línea superior se muestran las secuencias consenso de los límites exón -intrón (Lewin, 1986) los subíndices indican el porcentaje de conservación de cada base y las flechas marcan los límites del intrón. En la parte inferior se encuentra la secuencia obtenida en *D.subobscura*, que se adapta perfectamente al consenso.

La señal de poliadenilación se encuentra a 260 pb de bases del final de la secuencia codificante en *D.subobscura*, que tendría un *trailer* mayor que el de *D.melanogaster*, con 175 pb, debido a numerosas inserciones producidas en *D.subobscura*. No observamos ninguna conservación en esta región y no parecen existir elementos funcionales.

#### 4.4.1.2. SECUENCIA CODIFICANTE

El análisis de la secuencia codificante nos muestra que, en general, gran parte de la variabilidad se debe a las numerosas inserciones existentes en *D.subobscura*, que provocan en varias ocasiones la pérdida de la pauta de lectura durante varios codones, aunque ésta se recupera luego mediante alguna delección compensatoria. Podemos poner como ejemplo más espectacular la inserción de 40 pb en el punto 653 de *D.subobscura*, que además produce la pérdida de la pauta de lectura durante 10 codones, que se recupera por una delección sencilla en la posición 723, un efecto similar producen la inserción de la posición 743 y unas pequeñas delecciones en las posiciones 715 y 793 de *D.melanogaster*. El resto de inserciones o delecciones es de un número de bases múltiplo de 3 por lo que la pauta de lectura no se ve afectada.

AT0	T	T	T	C	G	T	T	S	A
AT1	T	T	T	C	T	T	T	G	A
AT2	A	T	T	C	K	T	T	C	A
AT3	T	T	T	T	A	T	T	G	A
CONSENSO	W	T	T	Y	D	T	T	S	A

La representación que hemos usado ha sido: W= A o T; S= C o G, K= A o C y D= A o G o T.

Tras el análisis de la región distal realizamos la comparación de la región promotora completa entre *D.melanogaster* y *D.subobscura* y realizamos una búsqueda de motivos de unión para proteínas reguladoras que estuviesen conservados en ambas especies. Para ello aplicamos el programa FINDPATTERNS del GCG, que es capaz de hallar sobre una secuencia los posibles motivos que posee en una extensa base de datos. La búsqueda de estas secuencias diana se realizó para cada especie por separado, obteniendo más de 100 posibles motivos en cada una de ellas. A continuación como criterio de selección de sitios funcionales establecimos qué motivos estaban conservados en ambas especies y además estaban situados en una posición equivalente, con lo que el número de posibles secuencias diana quedó reducido a unas 20.

Algunos de estos elementos ya los hemos descrito anteriormente en el estudio de la región distal del promotor. Además de éstos pudimos identificar secuencias diana de distintos factores de transcripción, que están presentes en los promotores de muchos genes eucariotas. Entre los factores de tipo general destacamos los tres octámeros: TAATAAAA, GATTCGA y AGGCAAT, que se han conservado totalmente en ambas especies. Las restantes secuencias diana identificadas son específicas de diferentes factores de transcripción (generalmente activadores) y nosotros las hemos indicado con el nombre del factor capaz de unirse a ellas y, a falta mejores evidencias, sólo apuntamos la posibilidad de que en *Drosophila* interaccionen con factores de transcripción relacionados con ellos (ver figura 17).

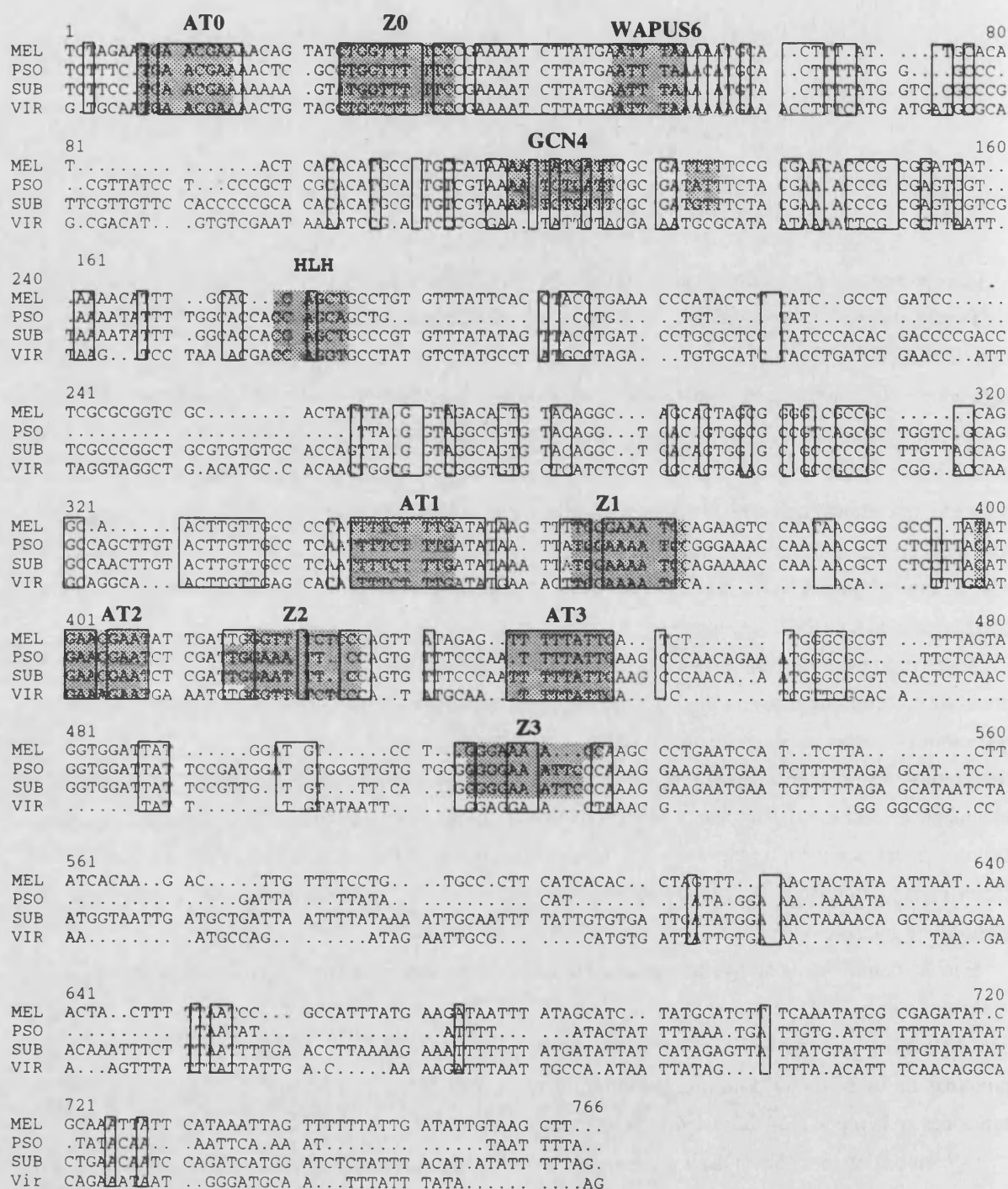
Hemos identificado 3 sitios como posibles dianas de proteínas de la familia HLH (hélice-lazo-hélice), señaladas como HLH1, 2 Y 3 en las posiciones -232, -734 Y -1436 de *D.melanogaster*, cuyo consenso es CANNTG y que pueden tener relevancia en la regulación específica del gen *zerknüllt*, puesto que proteínas de esta familia, a la que pertenece la codificada por el gen *twist*, desempeñan importantes funciones en la regulación del sistema dorsoventral.

Queremos destacar que en las 4 especies comparadas está conservado el sitio HLH1 en una posición equivalente:

consenso	C	A	N	N	T	G
<i>D.melanogaster</i>	C	A	G	C	T	G
<i>D.subobscura</i>	C	A	G	C	T	G
<i>D.pseudoobscura</i>	C	A	G	C	T	G
<i>D.virilis</i>	C	A	G	G	T	G

Este hecho apoyaría con mayor fuerza el este sitio fuera funcional.

Otras secuencias conservadas se han descrito como sitios de unión de las siguientes proteínas:



**Figura 19.-** Alineamiento múltiple de la región distal del promotor del gen *zerknüllt*. MEL=*D.melanogaster*; PSO=*D.pseudobscura*; SUB=*D.subobscura*; VIR=*D.virilis*. Se han recuadrado las bases conservadas en las 4 especies, destacándose en gris las secuencias analizadas por Kirov *et al.* (1993) y también las identificadas en este trabajo.

♦ WAPUS5 y 6: sus motivos de unión son, respectivamente CCAAGT y TTATAA y su naturaleza es desconocida. La secuencia de unión de WAPUS6 está conservada en las 4 especies analizadas en la región distal de promotor.

♦ GCN4: esta proteína es un activador de la transcripción y se ha descrito en los promotores de los genes relacionados con la síntesis de aminoácidos en levadura (Arndt y Fink, 1986). Las secuencias a las que se unen no tienen una distancia u orientación fijas respecto al punto de inicio de la transcripción y su consenso óptimo es RRTGACTC seguido de cortas repeticiones de timidinas. Hemos identificado dos secuencias de este tipo, aunque la situada en la región distal del promotor no está conservada en *D. virilis*. En la figura X están identificadas ambas secuencias, al igual que las repeticiones de timidinas que les siguen.

♦ ICSBP: en la posición -362 del promotor de *D. melanogaster* encontramos una secuencia que responde al consenso YRGTTTCRYTTYYN, descrita en ratón y a la que se une la proteína ICSBP. Esta proteína pertenece a la familia de los interferones, que son unos potentes biomoduladores, que regulan, entre otras cosas, el crecimiento celular (Driggers *et al.*, 1990). En *Drosophila* se han identificado secuencias homólogas a la proteína ICSBP mediante *southern blot* (Wilson *et al.*, 1983).

#### 4.4.2. COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS HOMÓLOGAS AL GEN *bicoid*

El gen *bicoid* ha sido caracterizado a nivel molecular en *D. melanogaster* y *D. pseudoobscura*, por lo que podemos comparar la secuencia de *D. subobscura* frente a las de estas dos especies. La región secuenciada en *D. subobscura* que presenta homología con el extremo 3' del gen *bicoid*, comprende el exón 4 y la región 3' no traducida hasta la señal de poliadenilación. La similitud de la región completa es del 62% respecto de *D. melanogaster* y del 74.3% respecto de *D. pseudoobscura*.

##### 4.4.2.1. SECUENCIA CODIFICANTE

El alineamiento de la secuencia del exón 4 en las 3 especies se presenta en la figura 20a. La similitud es del 74.3% respecto de *D. melanogaster* y del 97% respecto de *D. pseudoobscura*, lo que refleja la mayor proximidad filogenética con ésta última especie (ambas pertenecen al grupo *obscura*). Así mientras que los cambios ocurridos respecto a *D. pseudoobscura* se reducen a dos pequeñas inserciones (de 3 y 6 pares de bases), 6 cambios en la 3ª posición y 1 en 2ª posición de los tripletes, respecto de *D. melanogaster* la variación es mayor: una delección de 15 pb, una inserción de 12 pb y numerosos cambios en la identidad de las bases en las tres posiciones.

En la figura 20B presentamos la comparación de la secuencia de aminoácidos, obtenida mediante el programa TRANSLATE a partir de la secuencia nucleotídica. La similitud es del 88.5% entre *D. melanogaster* y *D. subobscura* y del 98.9% entre esta última y *D. pseudoobscura*. El número de aminoácidos es casi idéntico, 94 en *melanogaster* y *pseudoobscura* y 95 en *D. subobscura*.

A)

```

1                                     70
MEL TTCTAAATGCGTTCGCTCTCTCCCTAGATCTTGGAGCCTTTGAAG.....GGTCTGG
PSE --TCCAT-C-CA-T.-C-ATGT...--A-C-----GC-A---AGCCATACGGTTGTGGTT-----A-
SUB --CTTCT-C-AT-CG-C-ATAC...--A-C-----GC-G---AGCCATACGGTTGT...T----A-

71                                     140
MEL ACAAGAGCTGCGACGATGGCAGTAGCGACGACATGAGCACCGGAATAAGAGCCTTAGCAGGAACCGGAAA
PSE ----A-----T-----C-----T--C-----A--C--GC-G-TGC-GT-G-----
SUB ----A-----T-----C-----T--T-----T--C--GC-G-TGC-GT-G-----

141                                     210
MEL TCGTGGAGCGGCATTTGCCAAATTTGGCAAGCCTTCGCCCCACACAAGGCC...CTCAGCCGCCCTCGGG
PSE ---C-----C...-----A--A---G--GGA--G-C--A.....A--A--G-C-CC-
SUB ---C-----C...-----G--A---G--GCC--G-C--AGCCACAA--A--G-C-CC-

211                                     280
MEL ATGGGGGGCGTGGCCCTGGGCGAATCGAACCAATATCAATGCACGATGGATACGATAATGCAAGCGTATA
PSE CCATT---GA--A...--CAT--CA-----T-----
SUB CCATT---GA--A...--CAT--CA-----T-----

281                                     350
MEL ATCCCCATCGGAACGCCGCGGGCAACTCGCAGTTTGCCTACTGCTTCAATTAGCCTGGAC.GAGAGGCGT
PSE ---G-----T--T---GA-----TA-A-----C---TAGTATTC...CC-G-G
SUB ---G-----T--T---GA-----CA-A-----C---TAGCAGCCTAGCC-G-G

354
MEL GTTA
PSE TAG-
SUB GAG-

```

B)

```

1                                     50
MEL ILEPLK.... ..GLDKSCDD GSSDDMSTGI RALAGTGNRG AAFKFGKPS
PSE N-----SHTV VV-----M -V-S-R-... .-----
SUB N-----SHTV V.-----M -V-S-R-... .-----

51                                     100
MEL P....PQGPQ PPLGLGGVAL GESNQYQCTM DTIMQAYNPH ARNAGNSQFA
PSE AGQAQ-...-P ---M....M H-T----- ---G--T---
SUB AAQAQ-QP-P ---M....M H-T----- ---G--T---

104
MEL YCFN
PSE ----
SUB ----

```

**Figura 20.-** Alineamiento de las secuencias de DNA (A) y proteína (B) del exón 4 del gen *bicoid* de *Drosophila melanogaster* (MEL), *D.pseudoobscura* (PSE) y *D.subobscura* (SUB). Ambos se han realizado con el programa CLUSTAL. La numeración se ha establecido de modo arbitrario para todas las especies.

#### 4.4.2.2. REGIÓN 3' NO TRADUCIDA

El primer análisis de la región 3' no traducida del gen *bicoid* fue realizado por Seeger *et al.* (1989) mediante la comparación de la secuencia en *D.melanogaster* y *D.pseudoobscura*. Posteriormente, Macdonald en 1990, extiende este estudio a 6 especies más: *D.melanogaster*, *D.sechellia*, *D.simulans*, *D.teissieri*, *D.virilis*, *D.picticornis* y *D.heteroneura*. En ambos trabajos se propone la existencia de unos dominios conservados en la estructura secundaria de los mensajeros *bicoid* en todas las especies, que serían fundamentales para el transporte de mRNA hasta el óvulo de *Drosophila*. La conformación espacial de estos dominios sería reconocida por las proteínas encargadas de transportar el mensajero, además de contribuir a la estabilidad del mismo. En la figura x presentamos la estructura secundaria del trailer de este gen en *D.melanogaster*, en el que pueden apreciarse 5 dominios estructurales, identificados por Macdonald y señalados con números romanos.

Hemos comparado la secuencia obtenida en *D.subobscura* con todas las descritas en los trabajos anteriores aplicando el programa de alineamientos múltiples CLUSTAL, y el resultado obtenido ha sido modificado posteriormente en función del trabajo de Macdonald. El alineamiento resultante aparece en la figura 21, en la que las secuencias conservadas en todas las especies se han encerrado en cuadros y en la que se indican con flechas los diferentes dominios estructurales hallados en *melanogaster* y *D.subobscura*, pudiéndose apreciar la conservación existente entre ellos.

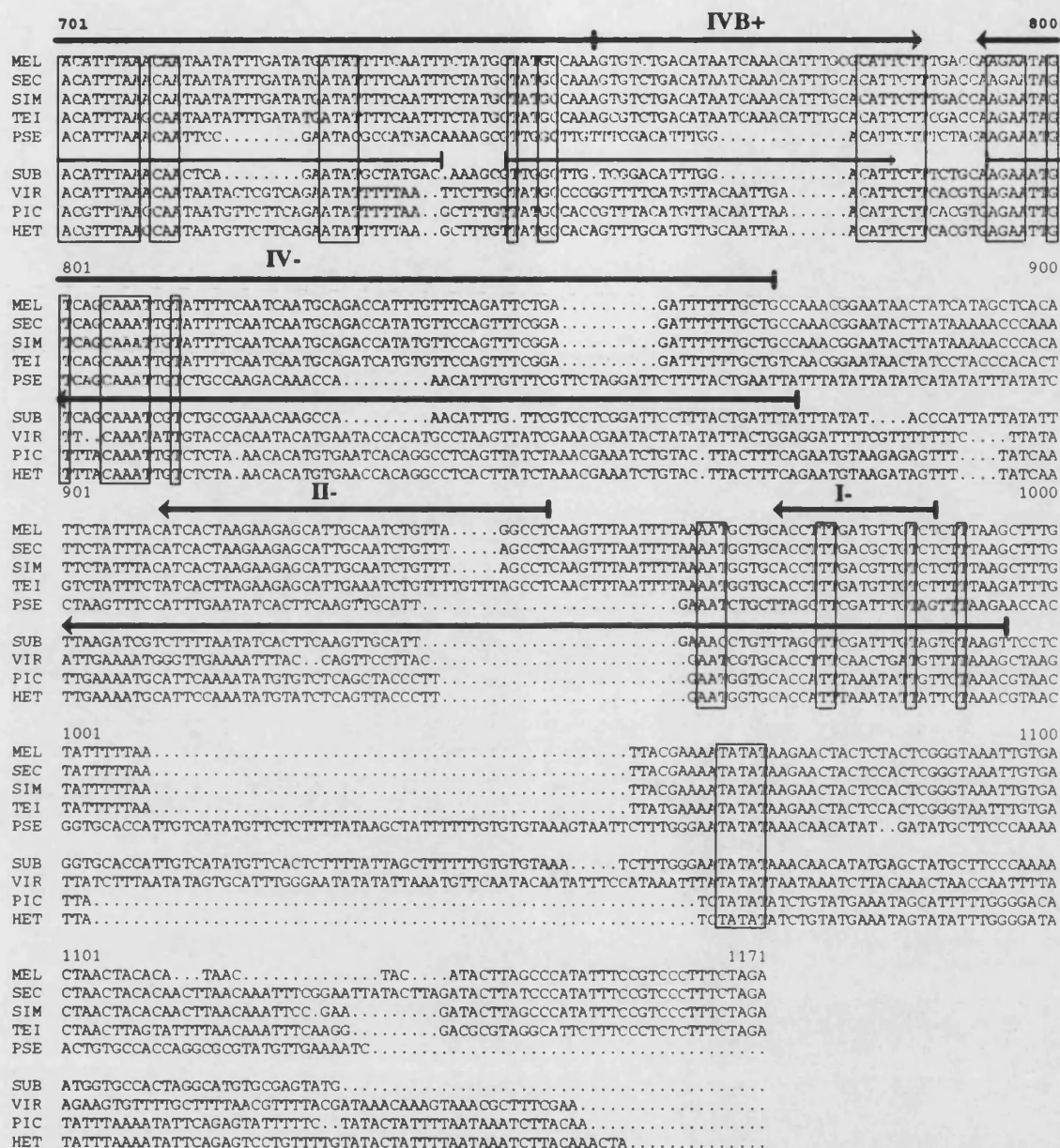
Esta conservación es más aparente en los diagramas de la figura 22: para ambas especies en los que vemos la existencia de dominios estructurales similares en ambas especies. Estos diagramas se han elaborado mediante el programa MFOLD del GCG, que calcula todas las posibles estructuras secundarias de una secuencia ofreciendo las más estables en función de su energía libre. La diferencia más notable entre ambas especies es que mientras Macdonald señala 5 dominios en *melanogaster* (I a V), en *D.subobscura* podría haber solo 4, puesto que la región variable que existe en *D.melanogaster* no ha sido encontrada en *D.subobscura* y los dominios I y II podrían considerarse como uno solo.

Hemos intentado localizar en todas las especies analizadas un motivo de 9 nucleótidos descrito por Gottlieb (1992), que responde al consenso YUGUUYCUG (Y= C o U). Este motivo se ha encontrado en las regiones 3' no traducidas de RNA mensajeros que sufren procesos de transporte celular, como los de los genes *bicoid* y *nanos* de *D.melanogaster* y *Vg1* y *An2* de *Xenopus*. Los experimentos realizados con el gen *bicoid* revelan que esta secuencia es necesaria para la correcta localización del mensajero, aunque la estabilidad del mismo no se ve afectada. Nosotros hemos localizado secuencias de este tipo en todas especies (realizadas en gris en el alineamiento múltiple), localizadas en una región muy conservada del trailer:



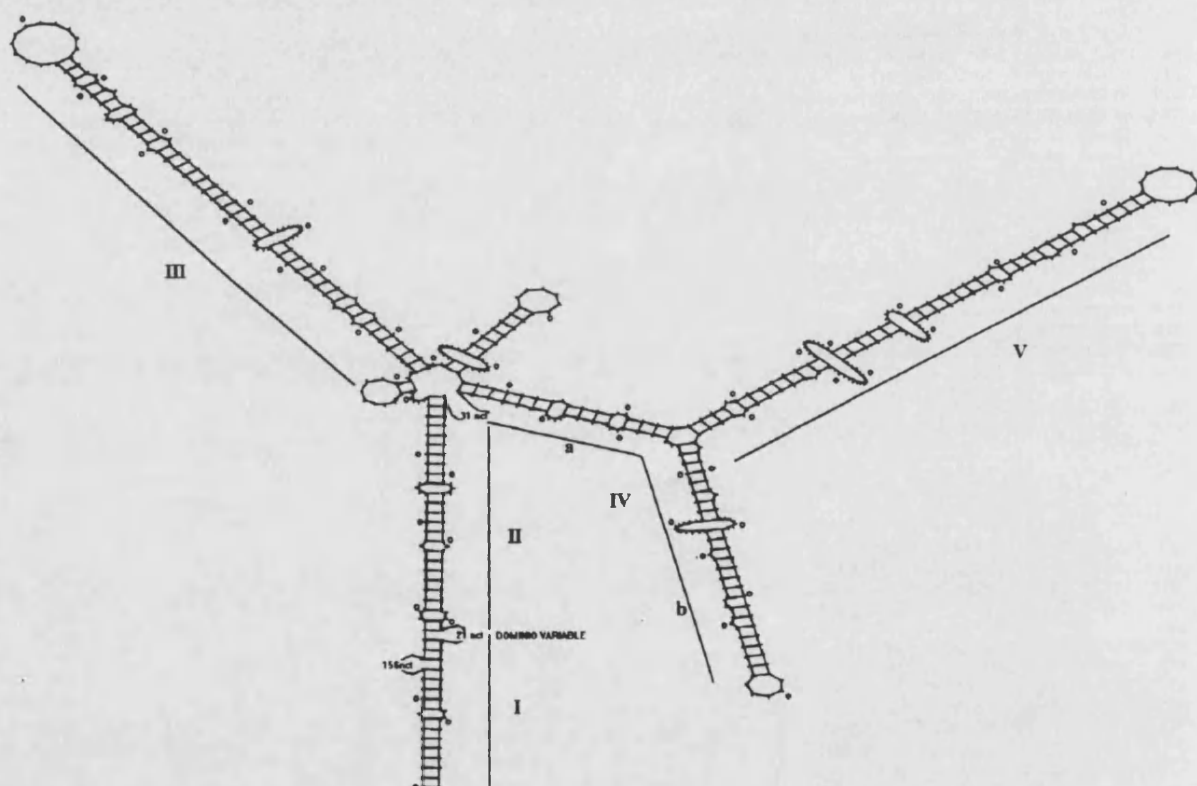
## 80

[illegible]

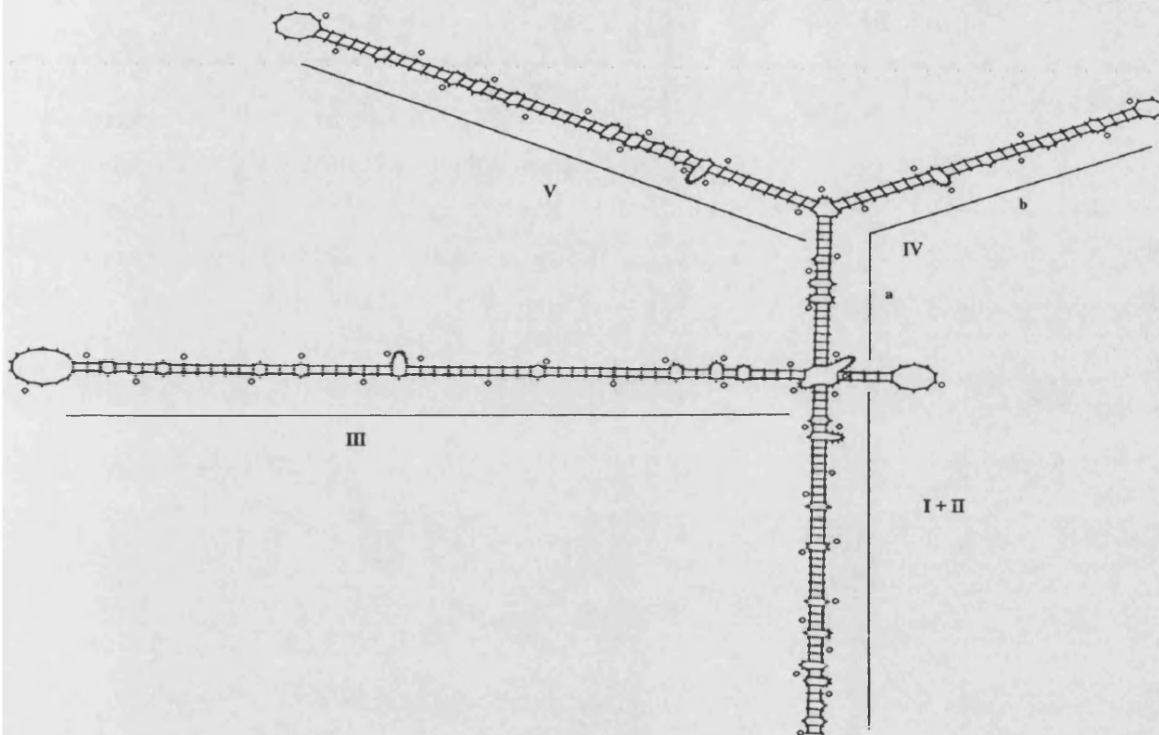


**Figura 21.-** Alineamiento múltiple de la región 3' no traducida del gen *bicoid*, realizado a partir del de Macdonald (1992). Los recuadros encierran las secuencias conservadas en las 9 especies; las flechas sobre las secuencias señalan los diferentes dominios de estructura secundaria en *D.melanogaster* y *D.subobscura*; en gris se destaca el consenso descrito por Gottlieb (1992). El alineamiento se realizó con el programa CLUSTAL. MEL=*D.melanogaster*, SEC=*D.sechellia*, SIM=*D.simulans*, TEI=*D.teissieri*, PSE=*D.pseudoobscura*, SUB=*D.subobscura*, VIR=*D.virilis*, PIC=*D.picticornis*, HET=*D.heteroneura*.

A)



B)



**Figura 22.-** Estructura secundaria de la región 3' no traducida del gen *bicoid* de *D.melanogaster* (A) y *D.subobscura* (B). En ambos casos se puede apreciar la existencia de dominios estructurales conservados, que están identificados mediante números romanos. La diferencia más apreciable es que en *D.subobscura* existiría un dominio menos pues los dominios I y II podrían ser uno solo al no existir una región variable entre ellos, como ocurre en *D.melanogaster*. Las estructuras secundarias se han realizado con el programa FOLD incluido en el paquete GCG.

CONSENSO	Y	T	G	T	Y	Y	C	T	G	
<i>D.MELANOGASTER</i>	T	T	G	T	T	C	C	T	G	
<i>D.SECELLIA</i>	T	T	G	T	T	C	C	T	G	
<i>D.SIMULANS</i>	T	T	G	T	T	C	C	T	G	
<i>D.TEISSIERI</i>	T	T	G	T	T	C	C	T	G	
<i>D.VIRILIS</i>	T	T	A	G	T	T	C	C	T	G
<i>D.PSEUDOOBSCURA</i>	T	T	G	T	T	T	C	C	T	G
<i>D.SUBOBSCURA</i>	T	T	G	T	T	T	C	C	T	G
<i>D.PICTICORNIS</i>	T	T	G	T	T	T	C	C	T	G
<i>D.HETERONEURA</i>	T	T	G	T	T	T	C	C	T	G

Puede observarse que el motivo se encuentra perfectamente conservado en la 4 especies pertenecientes al grupo *melanogaster*, en *D.subobscura*, *D.pseudoobscura*, *picticornis* y *heteroneura* aparece un motivo similar en la misma región, pero en lugar de un nonámero es un decámero. Finalmente, es *D.virilis* la especie que mas se aleja del consenso señalado por Gottlieb, pues posee un decámero en el que una G ha cambiado a A.

#### 4.5. ANÁLISIS CONJUNTO DE LAS SECUENCIAS

Para completar el análisis comparativo de todas las secuencias realizamos un estudio conjunto de los cambios producidos en las mismas mediante el programa DISTANCE diseñado por Agustín Galiana.

En primer lugar obtuvimos el número de transiciones y transversiones. Los resultados se ofrecen en la tabla inferior, en la que se especifica la longitud de las secuencias comparadas, así como el número de transiciones y transversiones, especificando el tipo de cambio producido; en las secuencias codificantes realizamos el análisis para cada una de las posiciones de los tripletes, que se indican como 1ª, 2ª y 3ª. Las comparaciones entre las distintas especies se indican en la 2ª columna de la izquierda: *m*=*melanogaster*; *s*=*D.subobscura* y *p*=*pseudoobscura*. Las secuencias comparadas han sido el exón 4 del gen *bicoid* (*bcd* E4), su región 3' no traducida (*bcd* 3'), la región promotora del gen *zerknüllt* (*zen* 5') y la región codificante del mismo (*zen*).

CAMBIOS EN LA IDENTIDAD DE LAS BASES																
			TRANSICIONES						TRANSVERSIONES							
SECUENCIA			TOT	A/G	C/T	1ª	2ª	3ª	TOT	A/C	A/T	G/C	G/T	1ª	2ª	3ª
<i>bcd</i> E4	<i>m-p</i>	361	38	20	18	5	9	24	34	6	18	13	5	12	7	15
	<i>m-s</i>		39	19	20	5	8	26	35	6	8	15	6	12	9	14
	<i>p-s</i>		12	3	9	4	2	6	8	3	2	1	2	0	2	6
<i>bcd</i> 3'	<i>m-p</i>	817	111	51	60	-	-	-	106	22	39	19	23	-	-	-
	<i>m-s</i>		112	53	59	-	-	-	98	23	42	13	23	-	-	-
	<i>p-s</i>		58	14	44	-	-	-	42	6	17	7	12	-	-	-
<i>zen</i> 5'	<i>m-s</i>	1995	295	138	157	-	-	-	277	78	85	61	53	-	-	-
<i>zen</i>	<i>m-s</i>	1144	130	58	72	36	25	69	135	33	20	48	34	31	28	76

El número de transiciones y transversiones es similar para cada secuencia, lo que significa que todas ellas pudieran estar sometidas a una presión selectiva que impide que el número de transversiones sea el esperado por azar. También podemos comprobar cómo la distribución de los cambios refleja la naturaleza de las secuencias. Mientras que en las secuencias no codificantes el número de transiciones y transversiones se distribuye por igual, en las secuencias codificantes el mayor número de cambios se acumula en la 3ª posición de los tripletes. Este es un efecto directo de la degeneración del código genético, que permite cambios en la 3ª base de los codones sin que se altere la identidad del aminoácido.

El programa DISTANCE nos permite obtener la proporción de cambios sinónimos y de reemplazamiento que se han producido en las secuencias codificantes, empleando para ello el método de Nei y Gojomotori (Gojomotori *et al.*, 1990). Los resultados se presentan en la tabla siguiente, en la que hemos empleado la misma notación que en la anterior. En ella indicamos la fracción de cambios sinónimos y no sinónimos, que se estima a partir de los números real y potencial de cambios de cada

tipo. También se ofrece la corrección de Jukes y Cantor (Gojomori *et al.*, 1990), que se indica como el número de cambios de cada tipo por sitio.

SUSTITUCIONES EN LAS SECUENCIAS CODIFICANTES					
SECUENCIAS		Sustituciones SINÓNIMAS	POR SITIO	SUST. NO SINÓNIMAS	POR SITIO
<i>bcd</i> E4	<i>m-s</i>	0.476	0.756	0.130	0.143
	<i>m-p</i>	0.515	0.8732	0.136	0.150
	<i>p-s</i>	0.133	0.142	0.034	0.035
<i>zen</i>	<i>m-s</i>	0.552	1	0.145	0.161

Como es de esperar para unas secuencias codificantes el número de sustituciones silenciosas es mucho mayor que el de remplazamiento, puesto que la presión selectiva ha de actuar impidiendo el cambio en la identidad de los aminoácidos. Llama la atención el hecho de que el número de sustituciones silenciosas por sitio es 1 para el gen *zerknüllt* lo que indicaría que se han producido todos los cambios posibles de este tipo.

Finalmente calculamos la distancia entre las secuencias estudiadas empleando el método de Kimura de dos parámetros (Gojomori *et al.*, 1990), que contempla dos tasas diferentes, una para las transiciones y otra para las transversiones:

SECUENCIA		LONG.	DISTANCIA KIMURA 2 PAR.	VARIANZA
<i>bcd</i> E4	<i>m-s</i>	361	0.2872	0.0013
	<i>m-p</i>		0.3139	0.0016
	<i>p-s</i>		0.0649	0.0002
<i>bcd</i> 3'	<i>m-s</i>	871	0.3792	0.0008
	<i>m-p</i>		0.3612	0.0008
	<i>p-s</i>		0.1401	0.0002
<i>zen</i> 5'	<i>m-s</i>	1995	0.4595	0.0005
<i>zen</i>	<i>m-s</i>	1144	0.3136	0.0004

La menor distancia genética la presentan las secuencia codificantes de los genes, *bcd* y *zen*, que es similar en ambos casos al comparar *D.melanogaster* y *D.subobscura*. La región promotora del gen *zerknüllt* es la que menos se ha conservado entre ambas especies, con una divergencia aproximada del 46%. Por último, la conservación de la región *trailer* de *bicoid*, bastante mayor que la de la otra región no codificante refleja la importancia funcional de la misma.



#### 4.6. ANÁLISIS DEL PATRÓN DE EXPRESIÓN DEL ARNm DEL GEN *zerknüllt* DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Con el fin de comprobar si el gen que habíamos clonado en *D.subobscura* se transcribe con un patrón de expresión similar al de *D.melano-gaster* realizamos una hibridación *in situ* en embriones de *D.subobscura* y *D.melano-gaster*, con las sondas pDsW1.13 y pDmzen, respectivamente (Materiales y Métodos, apartado 6.2.1.).

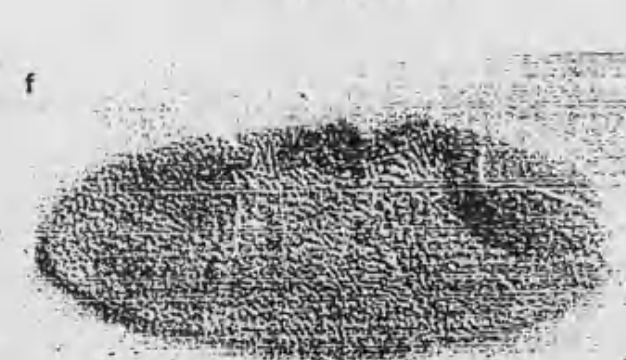
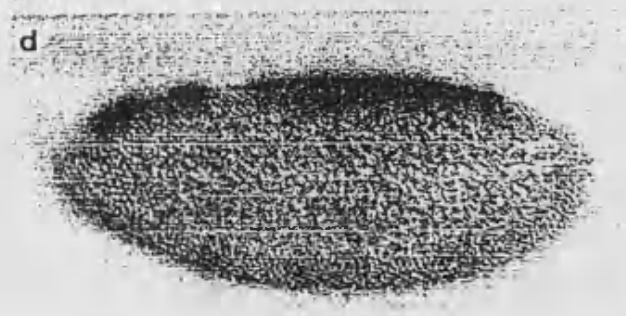
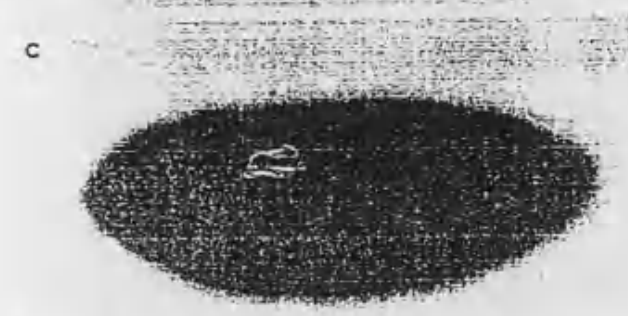
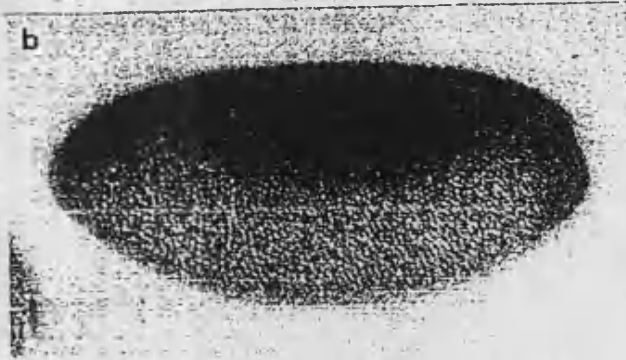
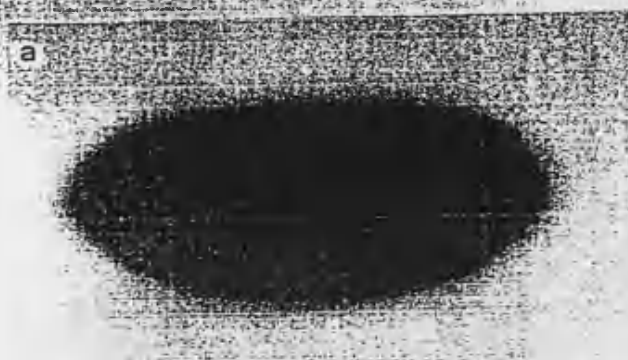
Tras el análisis de la expresión de los transcritos de *zen* en *D.subobscura*, no hemos podido apreciar diferencias significativas respecto a *D.melano-gaster*. Así, en ambas especies *zen* se expresa en la parte dorsal del embrión durante el estadio 4 tardío, abarcando aproximadamente el 40% de la circunferencia del mismo. En ambas especies la expresión en el polo anterior es bastante menos intensa que en el polo posterior (figs 23 a y b). Este patrón inicial se modula durante la celularización (figs 23 c y d.), de manera que en el estadio 5 el dominio de expresión del gen se reduce a una estrecha banda de 5 o 6 células de anchura en la parte más dorsal del embrión, que corresponde a la futura amnioserosa, y a dos manchas anteriores al pliegue cefálico, que se han identificado con el futuro lóbulo óptico (23 e y f, 24 a y b). En este momento la expresión de *zen* se reduce a un 10% de la circunferencia del embrión, como se puede apreciar en la figura 25 en la que se muestra una sección transversal de un embrión de *D.melano-gaster*. La expresión del gen va decayendo durante la fase rápida de la extensión de la banda germinal (figs 23 e y f, 24 c y d), hasta que desaparece totalmente y así en el estadio x ya no es posible detectar transcritos *zen* (24 g y h).

La expresión de *zerknüllt* en algunas células polares ha sido descrita en *D.melano-gaster* por Rushlow *et al* (1987) y Doyle *et al* (1989), sin que se le haya podido asignar ninguna función clara a la misma. Hemos comprobado que en *D.subobscura* también se produce la expresión de *zen* en un grupo de estas células: En ambas especies la señal sólo es apreciable a partir del estadio 5 y perdura después de que haya desaparecido la expresión de *zen* en la amnioserosa (fig. 26)).

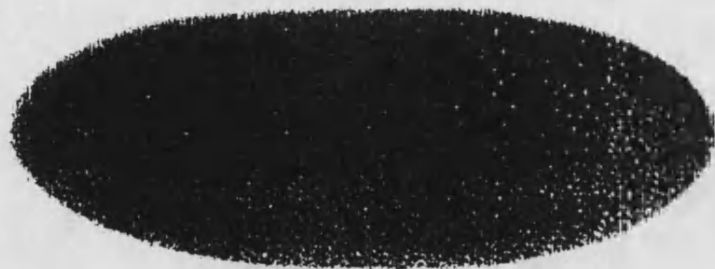
El estudio detallado de la expresión de *zen* en ambas especies nos ha permitido observar que, durante la modulación de su expresión aparece un patrón transitorio aparentemente segmentado, pudiéndose apreciar hasta siete bandas longitudinales en la parte dorsal del embrión (fig. 27). La existencia de esta expresión transitoria no ha sido descrita anteriormente y puede ayudar a comprender el proceso de modulación de la expresión de *zen*, en la que podría intervenir algún gen de segmentación.



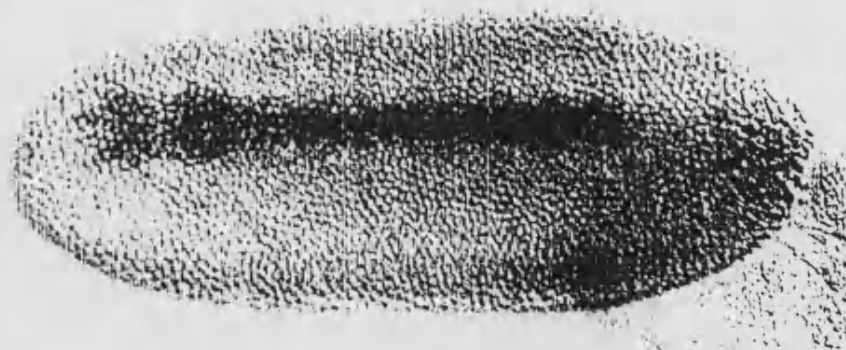
**Figura 23.** Patrón de expresión del RNAm del gen *zerknüllt* durante el desarrollo embrionario temprano de *D.melanogaster* (a, c, e, f) y *D.subobscura* (b, d, g, h)



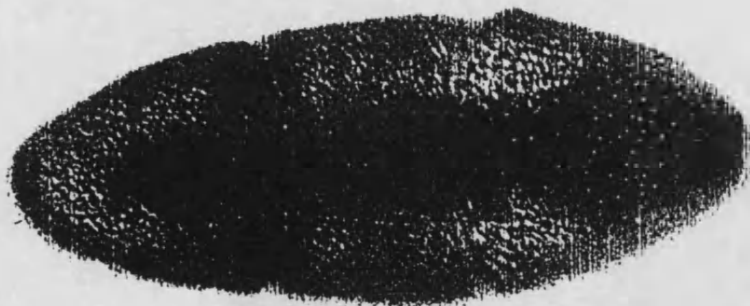
a



b



c



d

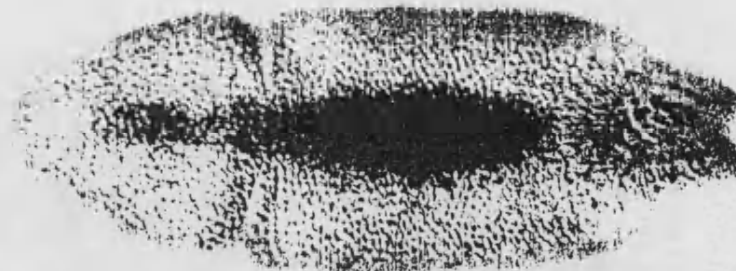
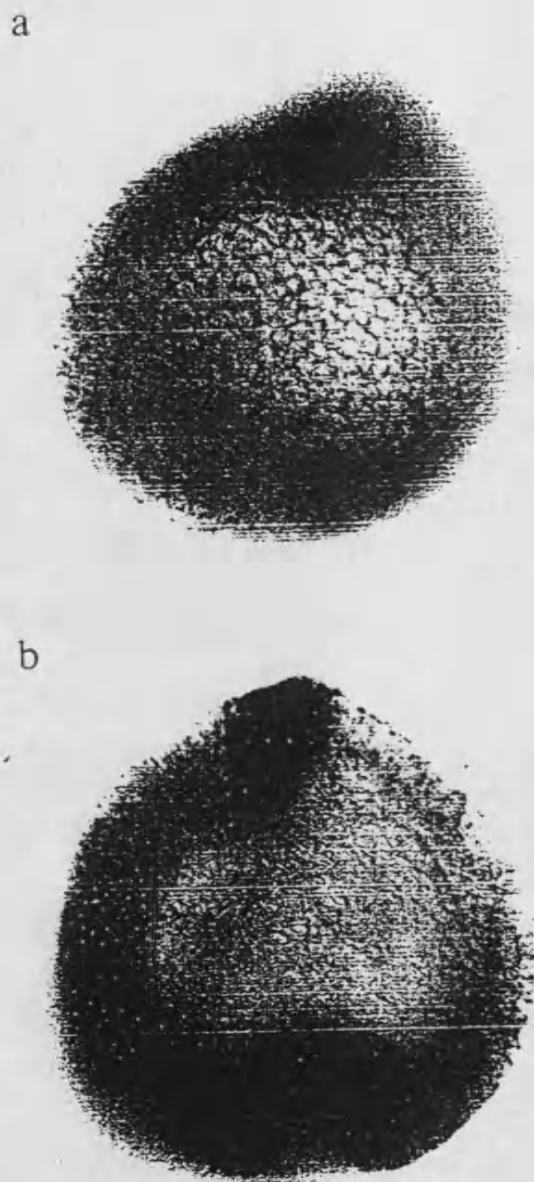


Figura 24. Vista dorsal del patrón de expresión del RNAm del gen *zerknüllt* en embriones de *D.melanogaster* (a, c, e) y *D.subobscura* (b, d, f).



**Figura 25.** Embrión de *D.melanogaster* de estadio 5 visto desde el polo anterior (a) y en una sección transversal (b) Puede apreciarse como la expresión del gen *zerknüllt* se reduce a una estrecha banda dorsal de unas 5 ó 6 células de ancho.

**Figura 26.** Expresión del gen *zerknüllt* en las células polares de embriones de *D.melanogaster*(a, c, e, g) y *D.subobscura* (b, d, f, h)



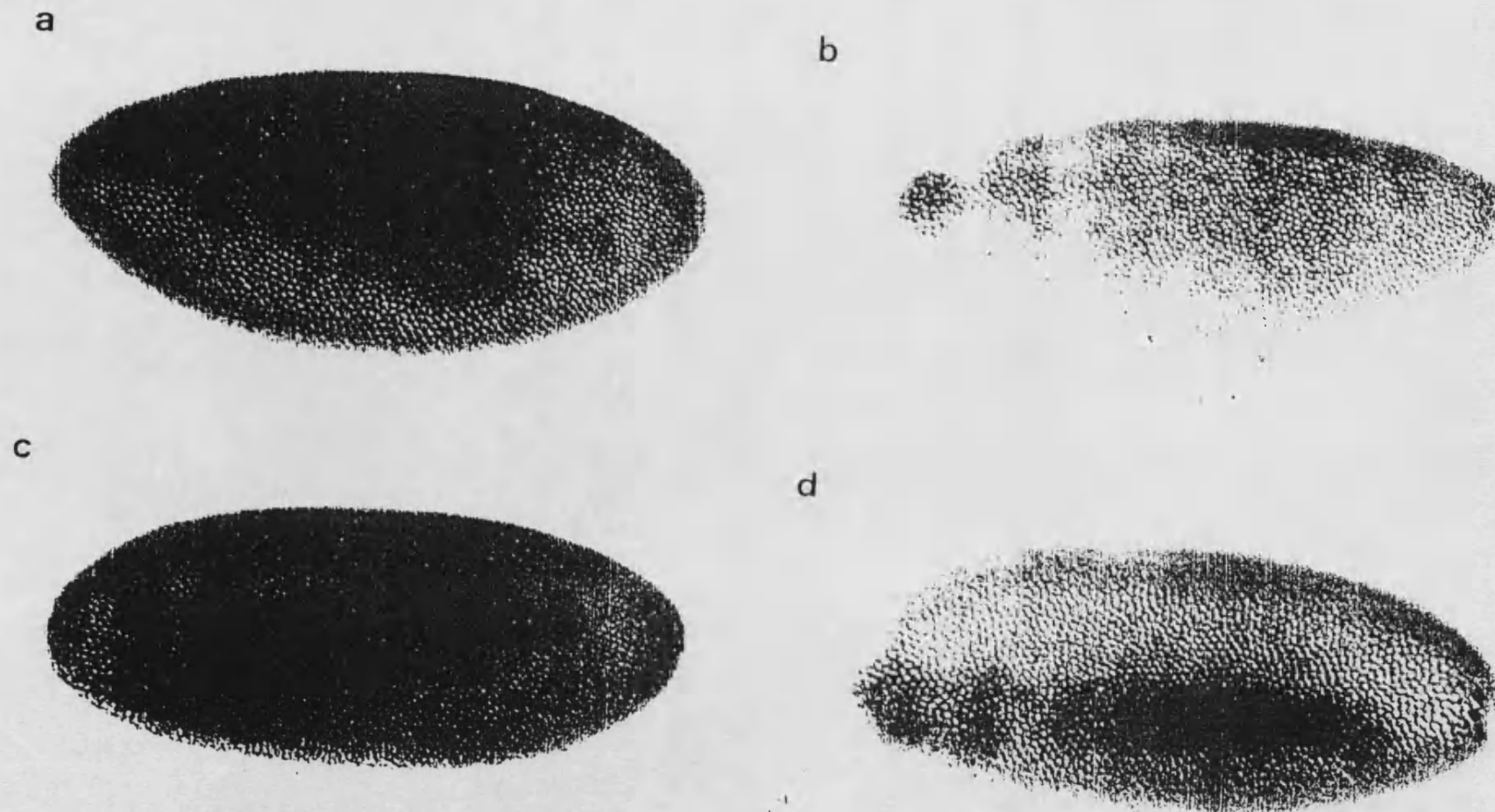


Figura 27. Expresión transitoria del gen *zerknüllt* durante la modulación de la misma en *D. melanogaster* (a) y *D. subobscura* (b).



#### 4.7. BÚSQUEDA DE SECUENCIAS HOMÓLOGAS A *z2* SOBRE EL DNA GENÓMICO DE *D.subobscura*

Al igual que hicimos con el gen *zerknüllt*, para intentar determinar la presencia de secuencias homólogas a *z2* en el genoma de *D.subobscura* realizamos el análisis del DNA genómico de esta especie mediante hibridación en filtro con la sonda pDsz2, en diferentes condiciones de exigencia de identidad. La sonda pDsz2 es un fragmento *AccI* del cDNA de *z2*, que comprende la región 3' del gen y excluye la *homeobox*; este fragmento se subclonó en PUC19 y la identidad de la sonda se comprobó mediante secuenciación de los extremos. De este modo pensábamos evitar hibridaciones cruzadas con la *homeobox* del gen *zerknüllt*. Como control positivo empleamos la sonda pDmzenEB que lleva la región 3' del gen *zerknüllt* de *D.melanogaster*, sin la *homeobox*, resultado de la digestión con las enzimas *EcoRI* y *Bst*II. Esta sonda también fue comprobada secuenciando sus extremos. En cada experiencia se digerían unos 3 µgrs de DNA genómico, extraído de moscas adultas, con las enzimas de restricción *AccI*, *Bam*HI y *EcoRI*; el producto de la digestión se corría en un gel de agarosa y se transfería a filtros de nylon. Un filtro se hibridaba con la sonda pDmzenEBs y otro con pDmz2A, realizando todo el proceso en paralelo. Todas las hibridaciones se realizaron en la mismas condiciones, variando los lavados para conseguir diferente exigencia de identidad.

Inicialmente, realizamos hibridaciones homólogas, es decir de DNA genómico de una especie frente a la sonda correspondiente, empleando la máxima exigencia de identidad (0.1x SSC y 65°C). Así hibramos DNA de *D.melanogaster* frente a las sondas pDmzenEBs y pDmz2A, y DNA de *D.subobscura* frente a pDsW1.13. Las señales obtenidas correspondían a bandas únicas en cada carrera, y su tamaño se aproximaba al calculado en el mapa de restricción de esta región en ambas especies. El resultado de las hibridaciones lo presentamos en la parte inferior de la figura 28, pudiéndose comprobar la especificidad de la señal.

En las hibridaciones cruzadas empleamos las sondas de *D.melanogaster* frente a DNA de las dos especies corrido en paralelo. Las condiciones de lavado usadas inicialmente fueron 0.5x SSC y 60° C y, debido al elevado número de señales inespecíficas obtenidas se elevaron a 0.2x SSC y 62°C. Sin embargo la única diferencia que observamos fue la disminución en la intensidad de todas las señales, incluidas las inespecíficas, con lo que el análisis resultaba así más dificultoso. En la figura 28 mostramos los resultados obtenidos y en ella se puede advertir que el número de bandas detectadas en las diferentes condiciones es el mismo, disminuyendo únicamente la intensidad de las señales.

Al comparar los filtros hibridados con cada una de las sondas podemos apreciar en ambos la existencia de bandas del mismo tamaño y de gran intensidad en las dos especies, que se han de deber a hibridaciones inespecíficas en ambas. Cuando aplicamos las condiciones de máxima exigencia de identidad desaparecen todas, lo que confirmaría esta idea.

A pesar de la gran cantidad de señales inespecíficas en *D.melanogaster* encontramos algunas bandas específicas para cada sonda cuyo tamaño coincide con el de las señales obtenidas en las hibridaciones homólogas. De esta manera podríamos establecer el criterio de que las bandas comunes a ambas sondas son inespecíficas y que aquellas que sólo aparecen en uno de los filtros (y tienen un tamaño aproximado al esperado) serían las específicas.



Sin embargo este criterio no ha sido útil al aplicarlo a las señales aparecidas en el DNA genómico de *D.subobscura* puesto que no hemos podido detectar bandas claramente diferentes con cada una de las sondas. Esto podría deberse a que los fragmentos de los genes empleados como sonda no están lo bastante conservados como para ser detectados.

Para comprobar ese extremo repetimos las hibridaciones anteriores, empleando como sonda los cDNAs completos de los dos genes, es decir con pDmzen y pGEMz2AccI, y con unas condiciones de lavado bastante relajadas: 50°C y 0.5xSSC (Figura 29). En este caso, se produjo la aparición de bandas no específicas, previsiblemente debidas a hibridaciones cruzadas con otros genes que poseen la *homeobox* y otros motivos conservados, aunque algunas de las señales obtenidas en *D.melanogaster* pudieron ser identificadas por ser del tamaño calculado a partir del mapa de la región. Para *D.subobscura*, los resultados obtenidos no fueron concluyentes, a pesar de que esta vez sí que fue posible identificar las señales correspondientes al gen *zerknüllt* de *D.subobscura*, pues algunas bandas tenían un tamaño similar al de las obtenidas con la sonda homóloga. Este hecho es apreciable en las carreras correspondientes a las digestiones *AccI* y *EcoRI*.

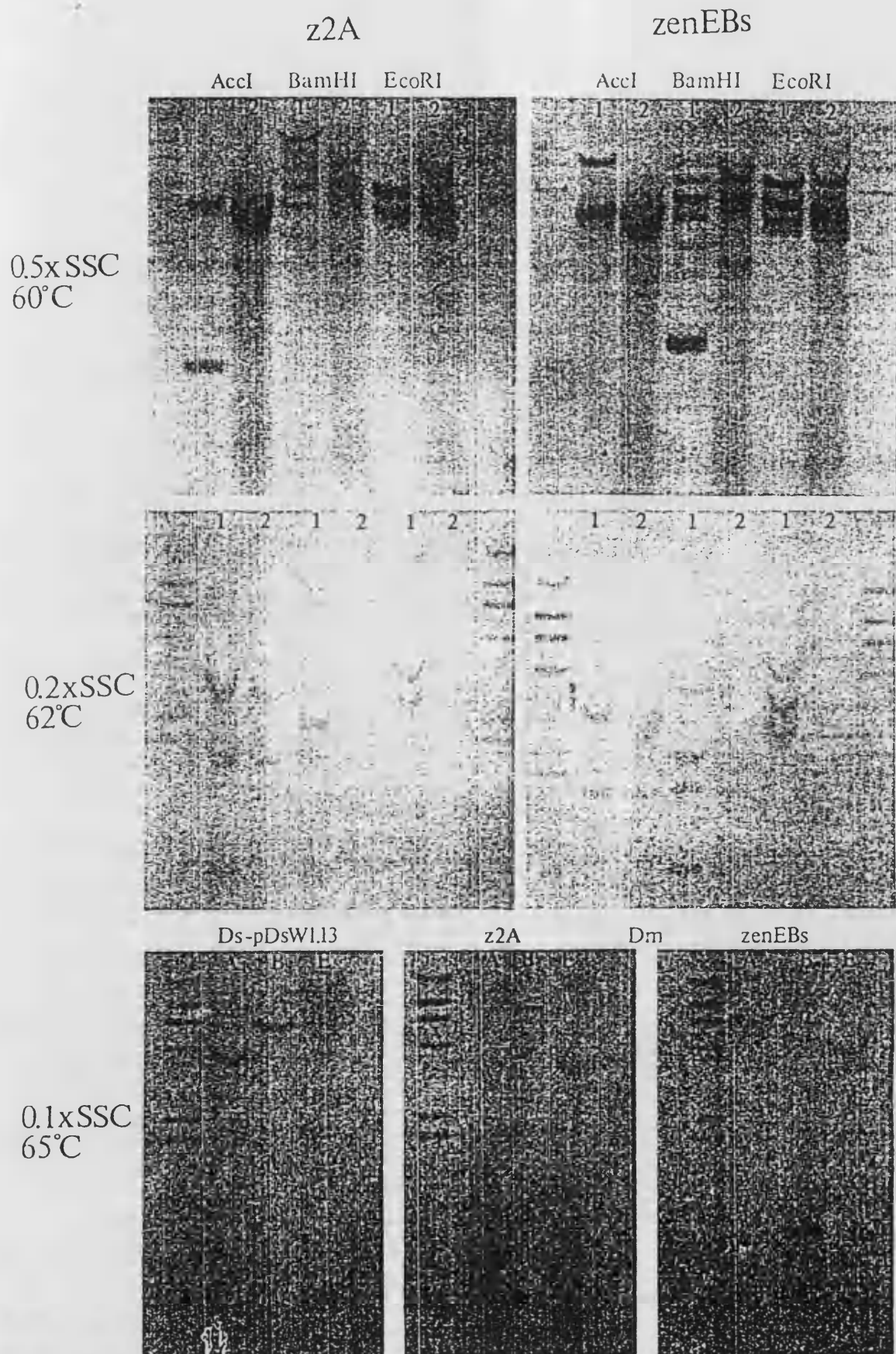
Los filtros hibridados con *z2* presentaron el mismo patrón de señales que los hibridados con *zen*, incluyendo las bandas correspondientes a este último, lo que podría explicarse por una hibridación cruzada entre sus *homeobox*. No nos fue posible determinar si alguna de las restantes bandas correspondía a secuencias homólogas al gen *z2*, ya que no existía diferencia alguna con los filtros hibridados con *zen*, y, sin embargo no podíamos descartar esa posibilidad. De la misma manera que con la sonda de *z2* obteníamos señales identificables con *zen*, el caso contrario también podría darse, y alguna de las bandas comunes en ambos filtros podría corresponder a este gen. Sería necesario conocer el tamaño de los fragmentos genómicos, para poder identificar cual de todas las señales se debía realmente a *z2*, en el caso de que este gen existiese en *D.subobscura*.

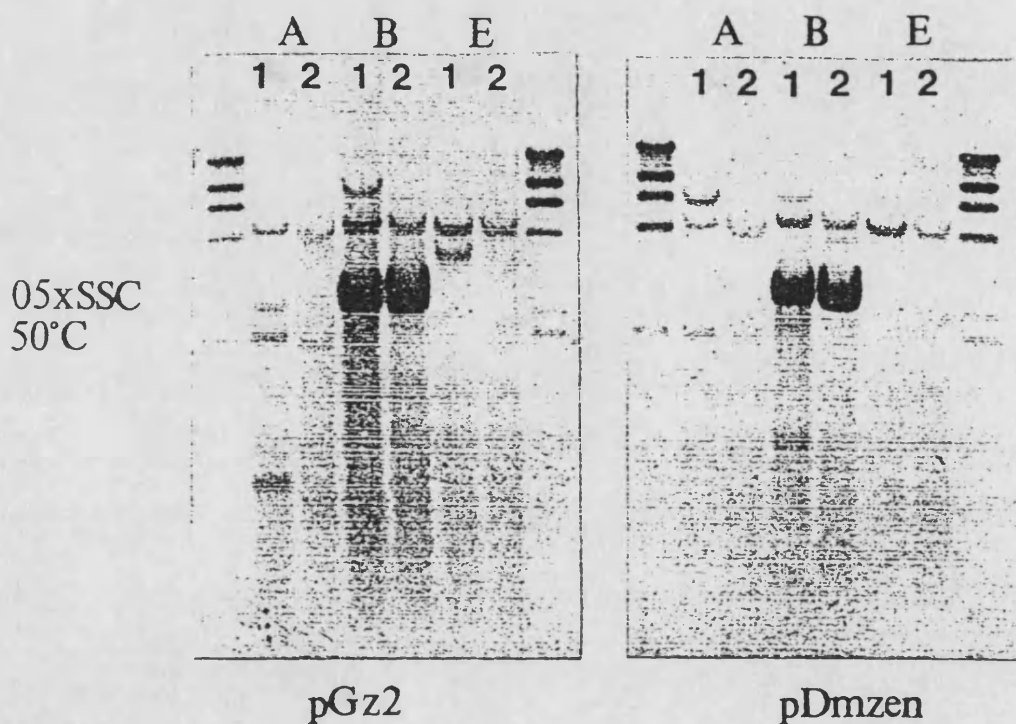
Debido a la imprecisión de los resultados obtenidos con los DNA genómicos, consideramos necesario realizar aproximaciones más directas, pasando a analizar directamente los clones de la genoteca que podrían contener al gen *z2* de *D.subobscura*.

#### 4.8. RASTREO CON LA SONDA pGEMz2Nde

Puesto que la distancia entre *zen* y *z2* es de unas 10 kb en *D.melanogaster*, y dada la conservación de la estructura del ANT-C encontrada entre *D.melanogaster* y *D.subobscura*, sería razonable pensar que ambos genes pudieran hallarse en los clones aislados en *D.subobscura* con *zen*, que abarcaban una distancia mayor. Por ello, intentamos identificar en ellos las posibles secuencias homólogas al gen *z2*. Sin embargo tras realizar la hibridación con la sonda correspondiente (pDmz2A) no pudimos detectar señal alguna que correspondiera al homólogo de *z2* en *D. D.subobscura*.

El hecho de no poder detectar este gen en los clones que habíamos aislado podría simplemente deberse a que en *D. D.subobscura* la distancia entre *zen* y *z2* fuera superior a la que existe en *D.melanogaster*. Como ignorábamos cual podía ser esa distancia y como poseíamos la sonda del gen *z2*, decidimos buscar directamente secuencias homólogas a *z2* en la genoteca de *D.subobscura*, y comprobar, en caso de hallarlos, si los clones del bacteriófago  $\lambda$  obtenidos ahora solapaban con los anteriores.





(En la página anterior) **Figura 28.** Resultado de las hibridaciones de DNA genómico hibridado con las sondas pDmzenEBs, pDmz2A de *D.melangaster*. 1= *D.melanogaster*; 2=*D.subobscura*. A= *AccI*; B=*BamHI*; E=*EcoRI*. En la parte derecha se indican las condiciones de lavado empleadas. En la parte inferior se muestran los resultados de las hibridaciones homólogas de ADN genómico de *D.subobscura* (Ds) frente a la sonda pDsW1.13 (*zen*) y de *D.melanogaster* (Dm) frente a pDmzenEBs y pDmz2A. El marcador de peso molecular es el fago  $\lambda$  digerido con *HindIII*.

**Figura 29.** Resultado de las hibridaciones de DNA genómico de *D.melanogaster* (1) y *D.subobscura* (2), digerido con las enzimas *AccI* (A), *BamHI* (B) y *EcoRI* (E), con las sondas pDmzen y pGz2NdeI, que poseen cDNAs completos de los genes *zen* y *z2*. Las condiciones de lavado usadas fueron 50°C y 0.5xSSC. Se indican con una flecha las bandas correspondientes al gen *zerknüllt* en *D.subobscura*.

Para el rastreo utilizamos directamente el fragmento *AccI* del cDNA de *z2*, que se aisló mediante electroelución, tras separar en un gel de agarosa el resultado de la digestión del cDNA. Como resultado del rastreo obtuvimos 6 clones positivos que sometimos a análisis de restricción con la enzima *EcoRI*. Pudimos comprobar que dos de los clones obtenidos,  $\lambda$ DsB1 y  $\lambda$ DsC2 tenían un patrón de restricción idéntico al de los clones  $\lambda$ DsU1 y  $\lambda$ DsQ2, respectivamente. Además al realizar la hibridación en filtro de estos clones frente a la sonda de *z2* electroluída el fragmento marcado era el mismo que con la sonda pDmzen. Los restantes clones presentaban un patrón de restricción diferente, pero ninguno presentaba fragmentos comunes con los clones obtenidos en el rastreo con pDmzen; por otro lado, al utilizar como sonda un fragmento *EcoRI* de 3 kb del clon  $\lambda$ DsU1, situado en el extremo contrario a la región secuenciada y por tanto, teóricamente más próximo al homólogo de *z2*, ninguno de los clones obtenidos daba señal de hibridación.

El hecho de haber obtenido de nuevo los clones  $\lambda$ DsU1 y  $\lambda$ DsQ2, cuando habíamos usado una sonda que teóricamente no podía hibridar con *zen* (la homología de estos dos genes fuera de la *homeobox* no es significativa), nos indujo a pensar que en la sonda habría alguna contaminación de la *homeobox* de *z2*. Esto explicaría que la señal de hibridación obtenida con la sonda electroluída coincidiera con la detectada con pDmzen.

Para conocer la naturaleza de los clones que hibridando con la sonda *z2*, no tenían fragmentos comunes con los clones  $\lambda$ DsU1 y  $\lambda$ DsU1, decidimos secuenciar parcialmente uno de los fragmentos que presentaban mayor intensidad en la señal de hibridación, que correspondía al clon  $\lambda$ DsC2. La secuencia obtenida era idéntica al 100% a la del clon pDsW1.13, lo que confirmaba nuestras sospechas de que la sonda utilizada en el rastreo debía estar contaminada con secuencias que podían hibridar con el homólogo de *zerknüllt* en *D. D.subobscura*. El hecho de que ninguno de los clones presentara fragmentos comunes podría explicarse por el polimorfismo de la genoteca, del que ya teníamos múltiples pruebas en otros rastreos realizados.

Para comprobar realmente la naturaleza de los clones obtenidos hibramos los clones obtenidos en el rastreo con la sonda electroluída, frente a la sonda pDmz2A (subclonada en un plásmido y por lo tanto sin contaminación alguna de otras partes del gen), en unas condiciones de lavado más permisivas, **no detectando señal alguna en ninguno de ellos**. Esto significaba que en el rastreo de la genoteca de *D.subobscura* no habíamos podido detectar ninguna secuencia homóloga al extremo 3' del gen *z2* de *D.melanogaster*.

Este hecho podría ser explicado porque el gen hubiera divergido tanto que no era posible detectarlo, a pesar de que las condiciones de identidad de secuencia habían sido relativamente suaves, o que este gen no está presente en el genoma de *D. D.subobscura*. Por lo tanto, para poder concluir algo sobre la existencia de *z2* en *D.subobscura* serían necesarias pruebas más concluyentes.

#### 4.9. PASEO CROMOSÓMICO HACIA EL GEN *proboscipedia*

En la figura 1 de la introducción, en la que se representa la estructura del complejo Antennapedia de *D.melanogaster*, podemos comprobar que el gen *z2* está situado entre *zerknüllt* y *proboscipedia*, a unas 2 Kb de distancia de este último. En *D.pseudoobscura* donde *z2* está ausente del complejo (Randazzo et

al., 1993) *zen* y *pb* son contiguos y están a una distancia similar a la que se encuentran en *D.melanogaster*.

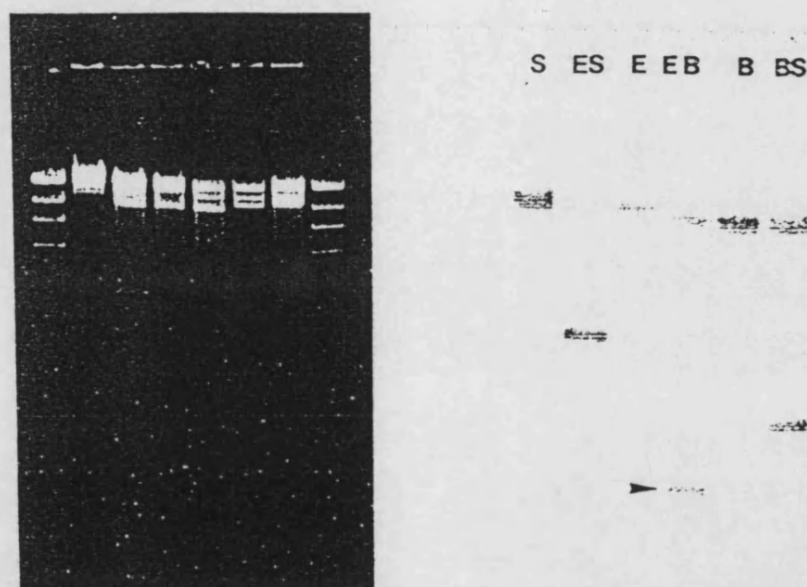
La clonación de toda la región existente entre los genes *zerknüllt* y *proboscipedia* de *D.subobscura* nos permitiría determinar con mayor precisión la existencia, o no, de secuencias homólogas a *z2* en la zona del complejo equivalente a la de *D.melanogaster* y *D.pseudoobscura*. La proximidad filogenética entre *D.pseudoobscura* y *D.subobscura* permitía esperar que la estructura del complejo sería similar en ambas especies y por lo tanto que la distancia entre ambos genes sería similar.

En primer lugar realizamos un rastreo de la genoteca de *D.subobscura*, empleando como sonda un oligonucleótido de 25 pb, cuya secuencia correspondía al inicio del exón 2 de *pb*, conservado en *D.melanogaster* y *D.pseudoobscura*. En el apartado 6.1.1. de Materiales y Métodos se indican las condiciones de lavado e hibridación empleadas en el rastreo, en el que obtuvimos 16 clones del fago  $\lambda$ , que purificamos por el método estándar. Para comprobar la identidad de los clones obtenidos elegimos uno de los clones,  $\lambda$ DspbC2, que mostraba gran intensidad de señal en la hibridación, y procedimos a extraer su DNA. Determinamos el mapa de restricción de este clon e identificamos los fragmentos que hibridaban con la sonda pbO, eligiendo uno de la digestión doble *EcoRI* y *BamHI*, de unos 900 pb de longitud (Figura 30). Una vez subclonado el fragmento en PUC19 llevamos a cabo una secuenciación parcial con los cebadores estándar, directo y reverso, y con el mismo oligonucleótido empleado en el rastreo. Las secuencias obtenidas, y su comparación con *D.melanogaster*, se incluyen en la figura 31, con lo que podemos comprobar que éstas corresponden al homólogo del gen *proboscipedia* de *D.subobscura*.

Con la intención de identificar directamente cuáles de estos clones solapaban con los obtenidos en el rastreo con la sonda pDmzen, realizamos un vertido en placa de los clones purificados, hicimos una réplica en filtro de las calvas e hibramos con el fragmento *EcoRI* de 3 Kb del clon  $\lambda$ pDsU1 (pDsU1.3) más alejado de las secuencias homólogas a *zen* (figura 10). Sin embargo, ninguno de los clones obtenidos hibridó con la sonda, y por tanto no existía solapamiento con los caracterizados anteriormente.

Decidimos comenzar un paseo cromosómico con la intención de alcanzar los clones que contenían secuencias homólogas a *pb* y cubrir así la región entre éste gen y *zerknüllt*. La primera sonda que se utilizó el rastreo fue pDsU1.3, y a partir de ella y en 4 pasos sucesivos clonamos, hasta la finalización de este trabajo, una región que abarca 45 Kb de DNA genómico de *D.subobscura*. Sin embargo, a pesar de la gran distancia avanzada ninguno de los clones parecía tener secuencias homólogas a *pb*, pues ninguno de ellos daba señal alguna al hibridar con la sonda procedente del clon  $\lambda$ DspbC2. Esto indicaba que la distancia entre *zen* y *pb* en *D.subobscura* era mucho mayor que en *D.melanogaster* y *D.pseudoobscura*, en las que ésta es de aproximadamente 10 Kb.

En la figura 31 presentamos la región *pb-zen* del ANTP-C de *D.melanogaster* y su equivalente en *D.subobscura*, hasta el punto alcanzado actualmente en el paseo cromosómico. También ofrecemos el mapa de restricción de ambas regiones, así como los diferentes clones del fago  $\lambda$  obtenidos durante la extensión del paseo cromosómico.



**Figura 31.** A) DNA del clon  $\lambda$ DspbC2, digerido con diferentes enzimas de restricción. E=*EcoRI*; B=*BamHI*; S=*Sall*; las digestiones dobles se indican con las 2 letras correspondientes. B) Filtro obtenido a partir del gel anterior, hibridado con la sonda pb4. La flecha indica el fragmento subclonado para utilizarlo como sonda.

A)

```

Dm  TTGGCGGAGTAGGCGTCAACGTTAATGTCAATGTCGGCGTCGGAGTCGGA 1409
Ds  C-----C-GT--T-----T--G-----C-----T----- 143

      TATCCGGTTGGCGTTG.....TCCCTCAAACGCCGGATGGAATGGACTC 1453
      -----G--T--G-GACCAA-G--A--G--A-G-----G----- 93

      GGTGCCGGAGTATCCCTGGATGAAGGAGAAGAAGACATCCCGCAAGAGCA 1503
      -----G--G----- 43

      GCAACAACAACAATCAGGGTGA 1525
      -----T--T----- 21

```

B)

```

Dm  GGGCACCCAAATCAAATCGGAATCTCCACTCAACCCGCTGCAGGTGCAAA 1059
Ds  ---A-----G-----G-----A--T--T-----G- 57

C   TGGACAGACGTCCCTGCCAGTGGGTGG   TTGCGGTGGTGCGGGC 1103
-   -----A-- CG-A-G--T-----TGT-G--T-----TT--T 106

      GTCGTGGGTGGTGTGGGTGGCGTGGGAGTGAGTGTGCTCAGCCTGGTAT 1153
      --- -CA--TC---T-----TT-- --G----- GG 140

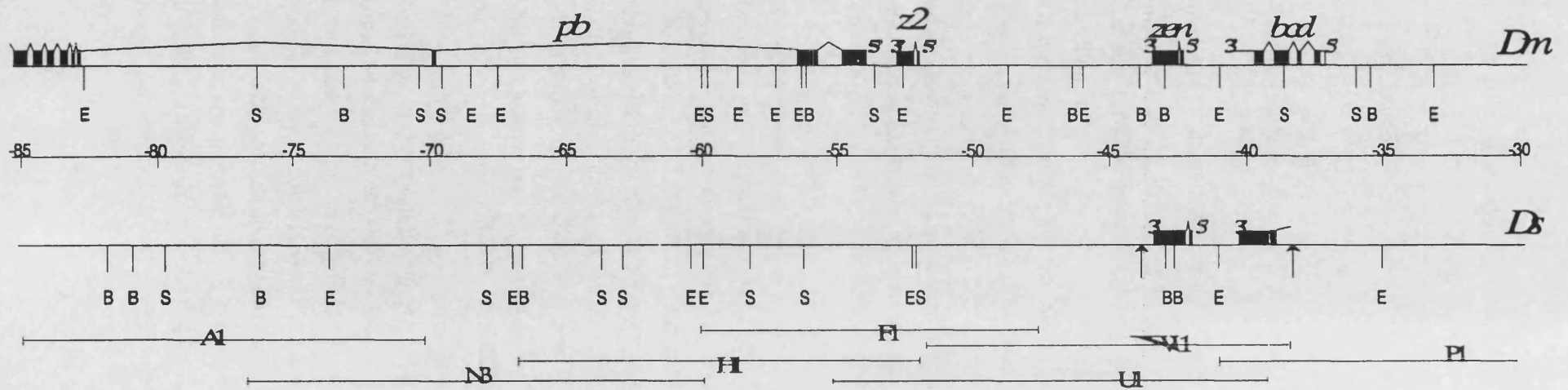
      CGGACAGCAGGGGGTGCCACCTGTGCCGTCCGTGCTCATGGTCAACAAGA 1203
      -----TGCT--V--C-----G- ---A--C-----T---- 189

      TGACCCCGAACTGTGATAAAC 1224
      --G--T----- 210

```

Figura 30. Comparación de las secuencias del gen *proboscipedia* de *D.melanogaster* (Dm) y *D.subobscura* (Ds). Las secuencias de *D.subobscura* se obtuvieron utilizando como cebadores el universal directo de PUC19 (A) y el oligonucleótido pbO (B), utilizado en el rastreo de la genoteca de *D.subobscura*. La numeración de la secuencia de *D.melanogaster* corresponde a la empleada por Cribbs et al., 1992.





**Figura 32.** Esquema del paseo cromosómico realizado en *D. subobscura* a partir del gen *zerknüllt*. En la parte superior de la figura se muestra una representación de la región equivalente complejo Antennapedia de *D. melanogaster* (según Seeger et al., 1988 y Pultz et al. 1988). Las coordenadas del complejo se han establecido a partir del mapa de Scott et al., 1983. En la parte inferior se ofrece la región clonada en *D. subobscura*, con la región secuenciada (indicada por flechas) y los diferentes clones de DNA genómico que la cubren. También se ofrece el mapa de restricción de las 2 especies: E=*EcoRI*; B=*BamHI*; S=*SalI*.



#### 4.10. LOCALIZACIÓN DEL COMPLEJO ANTENNAPEDIA EN LOS CROMOSOMAS DE *D.subobscura*

El hecho de no haber podido localizar al homólogo del gen *proboscipedia* en la región genómica aislada hasta el momento en *D.subobscura* nos indujo a pensar en la posibilidad de que se hubiera producido alguna inversión cromosómica que habría alterado la estructura del complejo Antennapedia en esta especie. También era posible que el orden de los genes se hubiera mantenido pero que la distancia entre ambos fuera mucho mayor.

La realización de una hibridación *in situ* en los cromosomas de *D.subobscura* nos permitiría averiguar la posición del gen *proboscipedia* y compararla con la del gen *Antennapedia*, conocida ya por anteriores trabajos (Terol *et al.*, 1990). Puesto que ambos genes se encuentran prácticamente en los extremos del complejo parecía posible apreciar alguna diferencia a nivel citológico. El gen *Antennapedia* se encuentra situado en la sección 80C del cromosoma O, como puede apreciarse en la figura 33, ocupando una zona clara entre dos bandas de gran intensidad.

La hibridación *in situ* la realizamos mediante técnicas no radiactivas, según el protocolo puesto a punto por de Frutos *et al.* en 1990. El resultado obtenido aparece en la figura 33, en la que se puede apreciar claramente que la señal se localiza en la sección 80D, siendo su posición claramente diferente de la del gen *Antp*. Es decir que en *D.subobscura* el gen *proboscipedia* se sitúa más alejado del centrómero que el gen *Antennapedia*.

Este hecho podría indicar que el complejo Antennapedia de la especie objeto de nuestro estudio podría estar en posición invertida respecto a la de *D.melanogaster*, en la que el complejo está orientado de manera que el gen más próximo al centrómero es *proboscipedia* y el más alejado es *Antennapedia*.

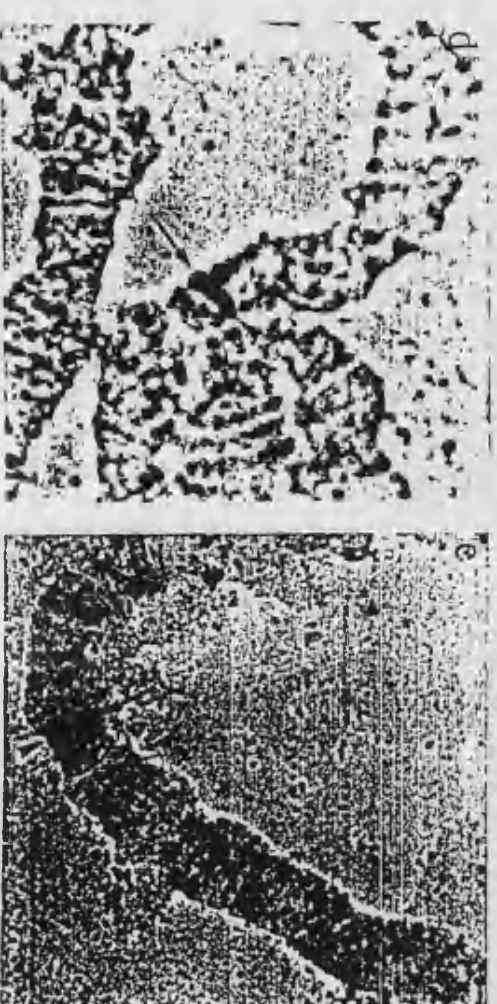
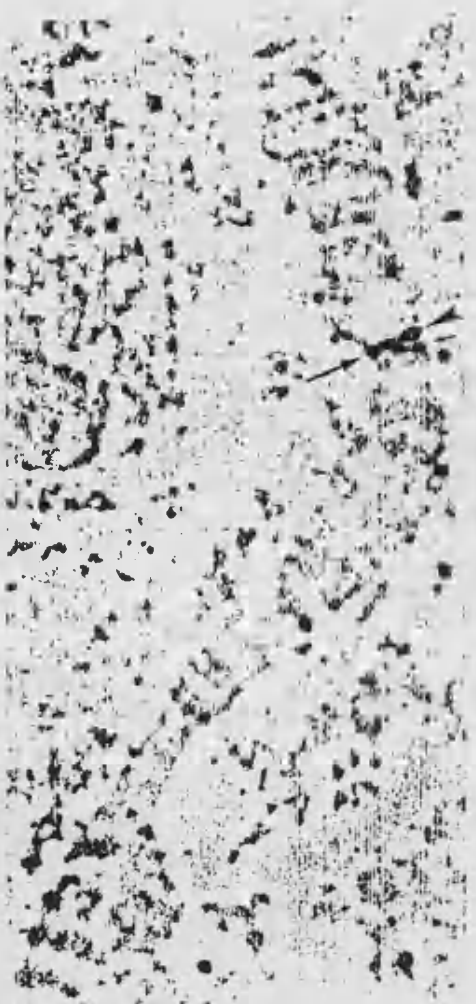
Para comprobar este último punto llevamos a cabo hibridaciones *in situ* utilizando como sondas los genes *zerknüllt*, situado en 5' respecto a *pb*, y *labial*, situado en 3'. Para la hibridación con *zen* empleamos la sonda pDsW1.13, que habíamos secuenciado con anterioridad, y el resultado lo presentamos en la figura 33. Como puede apreciarse, la posición del gen *zerknüllt* es la misma que la de *pb*, la última banda de la sección 80D, lo que nos indica que el paseo cromosómico se estaba realizando en la dirección correcta, aunque la distancia podría ser todavía mayor si consideramos el grosor de la banda en la que ambos genes se encuentran.

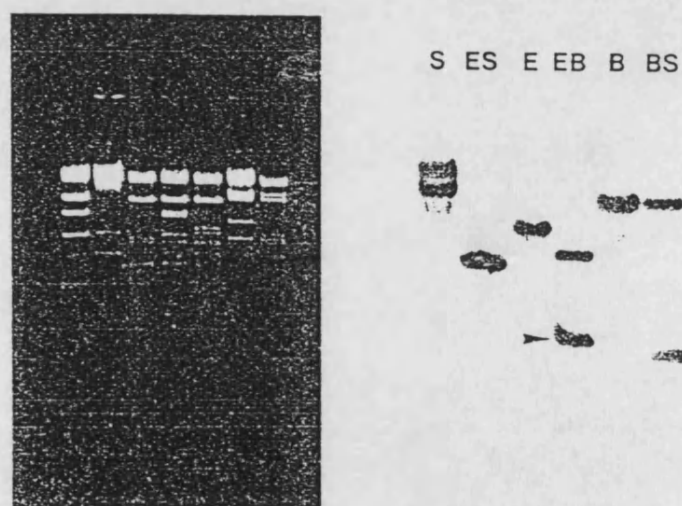
Para localizar la posición del gen *labial* decidimos emplear una sonda procedente de *D.subobscura*, para que la hibridación tuviera mayores probabilidades de éxito. Realizamos un rastreo de la genoteca de *D.subobscura* con la sonda procedente de *D.melanogaster*, PSC234; las condiciones empleadas fueron las indicadas en Materiales y Métodos para hibridaciones heterólogas. Obtuvimos 15 clones con secuencias homólogas al gen *labial*, realizamos la extracción de su DNA y elegimos el que dió mayor intensidad de señal al hibridarlos frente a la sonda de *D.melanogaster*, este clon fue  $\lambda$ DslabD1. Realizamos un mapa de restricción preliminar, digiriendo con las enzimas *EcoRI*, *BamHI* y *Sall*, y elegimos un fragmento de la digestión doble *EcoRI-BamHI* de unas x Kb, que hibridaba fuertemente con la sonda PSC234 (Figura 34).

Tras llevar a cabo la hibridación comprobamos que el gen *labial* presentaba la misma localización cromosómica que *pb* y *zen*, en la sección 80D (Figura 35). Esto significaba que los 3 genes se encontraban en la misma región genómica, como ocurre en *D.melanogaster* y *D.pseudoobscura*, aunque en *D.subobscura* la distancia entre *zen* y *pb* es, en principio, considerablemente mayor.

De esta manera, conocíamos la localización cromosómica de 5 de los 9 genes de complejo Antennapedia: *Antennapedia*, *bicoid*, *zerknüllt*, *proboscipedia* y *labial*. Puesto que la distancia entre los genes *zerknüllt* y *bicoid* es inferior a 2 Kb, podemos considerar que su posición citológica es la misma y por ello incluimos a *bicoid* en este grupo. Considerando que *Antennapedia* y *labial* se encuentran en los extremos del complejo y, si admitimos que la estructura del complejo génico está básicamente conservada en *D.subobscura*, podemos concluir que en esta especie el complejo Antennapedia ha sufrido una inversión respecto a *D.melanogaster*.

**Figura 34.** Localización cromosómica sobre el cromosoma O de *D.subobscura* de los genes *Antennapedia* (a), *proboscipedia* (c), *zerknüllt* (d) y *labial* (e). Se incluye una fotografía del cromosoma O (b) para permitir una mejor observación de la región. *Antp* se sitúa en la sección 80C, mientras que los otros 3 genes lo hacen en la 80D.





**Figura 33.** A) DNA del clon  $\lambda$ DslabD1, digerido con diferentes enzimas de restricción. E=*EcoRI*; B=*BamHI*; S=*Sall*; las digestiones dobles se indican con las 2 letras correspondientes. B) Filtro obtenido a partir del gel anterior, hibridado con la sonda pb4. La flecha indica el fragmento subclonado para utilizarlo como sonda.

## *5. DISCUSSION*



## 5.1. SOBRE LA COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA PROTEICA DE *zerknüllt*

### 5.1.1. ACERCA DEL GRADO DE CONSERVACIÓN DE LA PROTEÍNA *zen*

La similitud entre las proteínas para las que codifica el gen *zerknüllt* de *D.melanogaster* y *D.subobscura* es del orden del 85%. Este grado de conservación es inferior al 97% estimado para el producto del gen *Antennapedia* en esta misma especie (Hooper, Pérez-Alonso *et al.*, 1992), o al 92% de *Ubx* de *D.pseudoobscura* (Wilde y Akam, 1987). Sin embargo es del orden de la que se ha descrito para los genes HSP85 de *D.subobscura* (85%) (Arbona, 1993) o *bicoid* de *D.pseudoobscura* (81%) (Seeger y Kaufman, 1990).

Otras comparaciones se han realizado sobre especies más alejadas filogenéticamente, como *D.virilis* o *D.hydei*, lo que dificulta la comparación del grado de conservación de estas secuencias. Pero, aunque no podamos comparar directamente las diferentes similitudes de estos genes en las diversas especies, sí podemos establecer algún criterio si analizamos de modo independiente los datos de conservación. Así, la proteína codificada por el gen *Antennapedia* de *D.virilis*, presenta un 95% de identidad respecto a la de *D.melanogaster* (Hooper, Pérez-Alonso *et al.*, 1992), que es claramente superior a la conservación encontrada en otros genes como *engrailed* (70%, Kassiss *et al.*, 1986), *sevenless* (63%, Michael *et al.*, 1990), *rough* (60%, Heberlein y Rubin, 1990) o *hunchback* (80%, Treier *et al.*, 1989). Esto nos permite pensar que el grado de conservación del gen *Antennapedia* es superior al de otros genes de desarrollo y por lo tanto la encontrada para *zerknüllt* estaría dentro de lo esperado para *D.subobscura*, en función de los datos de otros genes.

### 5.1.2. DE LA DISTRIBUCIÓN Y TIPO DE LOS CAMBIOS DE LA SECUENCIA

Ya comentamos en la introducción que la conservación de muchas de las proteínas codificadas por genes del desarrollo no se producía de un modo homogéneo, sino que, por el contrario, existía en muchos casos una distribución irregular de zonas conservadas y zonas variables. Este fenómeno se ha encontrado en los estudios comparativos realizados en *Ultrabithorax* (Wilde y Akam, 1987), *engrailed* (Kassiss *et al.*, 1986), *Antennapedia* (Hooper, Pérez-Alonso *et al.*, 1992), *sevenless* (Michael *et al.*, 1990), *rough* (Heberlein y Rubin, 1990) y *hunchback* (Treier *et al.*, 1989).

Esta distribución de la variabilidad, se debe a que las inserciones y/o deleciones de aminoácidos se acumulan en determinadas regiones de la proteína. En muchos casos las regiones variables se identifican con secuencias cortas repetidas del tipo CAX, OPA o paired, descritas en *engrailed* (Kassiss *et al.*, 1986), *bicoid* (Seeger y Kaufman, 1990), *Antennapedia* (Hooper, Pérez-Alonso *et al.*, 1992) y *hunchback* (Treier *et al.*, 1989), respectivamente.

No hemos podido identificar repeticiones de este tipo en la secuencia proteica de *zen*. Antes bien, en el gen *zerknüllt* se produce el fenómeno que hemos comentado anteriormente, de modo que una inserción o delección producen un cambio de la pauta de lectura, que sólo se recupera después mediante una mutación compensadora. De esta manera, después de los aminoácidos ganados o perdidos, la secuencia proteica es completamente diferente en las dos especies, hasta que la inserción o delección compensatoria permiten que se recupere la pauta original. Y es en este aspecto en el que los cambios producidos en la proteína *zen* aparecen como únicos, pues hemos comprobado que, al menos en



*Antennapedia*, *hunchback*, *bicoid*, *engrailed* y *rough*, las inserciones y deleciones que se producen son siempre de un número de bases múltiplo de 3, por lo que la pauta de lectura de la proteína no se ve afectada en la especie en la que el cambio se ha producido. El único caso similar que hemos encontrado, dentro de los genes relacionados con el desarrollo, surge en la comparación del gen *Ubx* de *Drosophila* y saltamontes (Kelsh *et al.*, 1993), aunque, sin embargo, cuando se compara con el de *D.pseudoobscura*, *D.funnebris* e incluso mosca doméstica, los cambios no son producidos por alteraciones de la pauta de lectura (Wilde y Akam, 1992). El hecho de que *Drosophila* y *Schistocerca* sean ya organismos muy diferentes entre sí, y tengan distintos programas de desarrollo, podría ser suficiente para explicar los cambios en la proteína *Ubx*.

No tenemos una explicación plausible que justifique el diferente comportamiento evolutivo de *zerknüllt* respecto de los demás genes del desarrollo. Sabemos además de la dificultad que entraña el encontrar un mecanismo evolutivo que sea capaz de dar razón de este tipo de cambios, pues deberíamos admitir que éstos (los que causan la pérdida y la recuperación de la pauta de lectura) habrían de producirse simultáneamente, ya que en caso contrario la proteína *zen* dejaría de ser funcional.

Sería necesario tener datos de más especies para poder confirmar este tipo de comportamiento, que estaba ya descrito en secuencias necesitadas de una mayor variabilidad, como los elementos transponibles. También sería necesario contar con un mayor número de comparaciones de genes de desarrollo de especies del género, que nos permitiera saber si *zerknüllt* es un caso aislado dentro de este grupo de genes.

Si esto fuera así, podría estar relacionado con la existencia en *D.melanogaster* del gen *z2*, que es perfectamente funcional (Han *et al.*, 1987) y tiene un patrón de expresión casi idéntico al de *zen* (Rushlow *et al.*, 1987), por lo que no hay que descartar que pudiera llevar a cabo la función *zen* durante el desarrollo. De esta manera, al tener 2 copias funcionales estaría permitida una mayor variabilidad y así una mutación que causara el cambio de la pauta de lectura podría ser compensada por otra que se produjera posteriormente. Naturalmente, estos cambios deberían producirse en las regiones no esenciales de la proteína, para que esta pudiera seguir luego siendo funcional. Esta hipótesis se podría confirmar obteniendo la secuencia del gen *zerknüllt* de *D.pseudoobscura*, en la que ya se ha demostrado que el gen *z2* está ausente en esta especie (Randazzo *et al.*, 1993) por lo que sólo existiría un gen capaz de desarrollar la función *zen*.

Se ha descrito un caso similar al de *zen* y *z2*, el de los genes *engrailed* e *invected* (Coleman *et al.*, 1987), en el que ambos producen una proteína casi idéntica que se expresa con el mismo patrón, aunque la función de *invected* permanece desconocida. Puesto que ya hemos señalado que la proteína *engrailed* de *D.melanogaster* y *D.virilis* presenta los cambios acumulados en sus repeticiones CAX y no tiene cambios en la pauta de lectura, este sería un dato en contra de la hipótesis que hemos planteado. Sin embargo, mientras que no se demuestre que *z2* e *invected* son capaces de realizar por sí solos la función de *zen* y *engrailed*, nos moveremos sobre meras especulaciones.

### 5.1.3. LAS REGIONES CONSERVADAS, ¿DOMINIOS FUNCIONALES CRÍTICOS?

En todas las proteínas analizadas las zonas mejor conservadas corresponden a los principales motivos estructurales, que aparecen casi invariables. Así las *homeobox* de los genes *engrailed* (Kassirer *et al.*, 1986), *Antennapedia* (Hooper, Pérez-Alonso *et al.*, 1992), *bicoid* (Seeger y Kaufman, 1989), *rough* (Heberlein y Rubin, 1990) *Ultrabithorax* (Wilde y Akam, 1987) y del gen objeto de nuestro estudio, *zerknüllt*, codifican homeodominios idénticos en las diferentes especies que se han estudiado, y el gen *hunchback* de *D. virilis* sólo presenta un cambio conservativo respecto a *D. melanogaster* en el motivo de dedos de zinc que posee (Treier *et al.*, 1989). Las restantes regiones conservadas se identifican con dominios de función conocida, como los dominios kinasa y transmembrana del gen *rough*, o, como en la mayoría de casos con zonas cuya función no está todavía establecida, pero que debe ser de cierta relevancia.

En el caso del gen *zerknüllt* existen varias regiones bien conservadas candidatas a desempeñar funciones importantes: la región adyacente al extremo amino-terminal del homeodominio solo presenta 3 cambios sobre 18 aminoácidos, y la adyacente al carboxi-terminal 3 sobre 26, por lo que ambas podrían ser necesarias para la unión específica de la proteína *zen* sobre sus genes diana. Kuziora y McGinnis (1989) demostraron, en experiencias de expresión ectópica, que el reemplazamiento del homeodominio de *Deformed* y 5 residuos del extremo carboxi-terminal por los correspondientes de *Ubx* era suficiente para cambiar la especificidad de unión de *Dfd*, que adoptaba la de *Ubx*.

La zona mejor conservada del extremo carboxiterminal de la proteína *zen* comprende 32 aminoácidos (de la posición 264 a la 295 en *D. melanogaster*) y esta región podría estar implicada en la activación de la transcripción de las dianas *zen*. En las experiencias realizadas por Han *et al.* (1989), se analizaba la capacidad activadora de distintas proteínas homeóticas sobre un gen sometido al control del promotor de *engrailed* necesita. Además de la proteína completa, que elevaba el nivel de transcripción de manera considerable, se estudió la actividad de dos proteínas *zen* truncadas: a una de ellas le faltaba la parte carboxiterminal del homeodominio, desde el aminoácidos 236 al 354, y a la otra el extremo carboxi-terminal del polipéptido, desde el residuo 235 al 354. Ninguna de las dos proteínas mutantes era capaz de activar la transcripción del gen control, por lo que en la secuencias eliminadas deben encontrarse los dominios necesarios para su correcto funcionamiento. En el primer caso la eliminación de parte del homeodominio impediría a la proteína *zen* la unión a su secuencia diana; en el segundo caso, la unión al ADN sería posible y estaría ausente el dominio encargado de activar la transcripción. Los datos aportados por la comparación de las secuencias sugieren que este dominio podría encontrarse entre los aminoácidos 264 y 295 de la proteína *zen* de *D. melanogaster*; la carga neta de este fragmento es negativa, con 7 aminoácidos de carga negativa frente a 4 de carga positiva.

### 5.1.4. SOBRE LA EXISTENCIA DE SECUENCIAS PEST

La existencia de secuencias PEST en la proteína *zen* fue detectada por Kaufman *et al.* (1990), quienes las describían como regiones ricas en prolina, serina, treonina y glutámico. Estos dominios son propios de proteínas de vida media corta, lo que sería consistente con los dinámicos cambios en el patrón de expresión de *zen* en períodos de tiempo muy corto. *zen* no es el único gen de desarrollo que

posee estos motivos, también se han descrito en la proteína codificada por el gen *bicoid* (Seeger y Kaufman, 1990), cuya vida media se estima en media hora.

Las secuencias PEST fueron descritas originalmente por Rogers *et al.* (1986), quienes detallan algunas de las características principales de estos dominios: están flanqueados por aminoácidos de carga positiva, poseen numerosas cargas negativas agrupadas y son ricas en los aminoácidos mencionados anteriormente (P, E, S y T). En un intento de profundizar sobre el tema hemos localizado algunas posibles secuencias PEST sobre el producto *zen* de las especies que estamos analizando, y hemos comprobando la existencia de 3 de estos dominios bien conservados en ambas. Los 3 se aproximan a la estructura descrita por Rogers *et al.*, aunque dada la variabilidad de estos motivos es difícil precisar hasta qué punto los dominios que hemos descrito determinan realmente la vida media de la proteína. Además de las secuencias PEST, las proteínas de corta vida media poseen otras características como la existencia de numerosos pares Arg-Arg; nosotros hemos encontrado 5 de estos pares en *D.melanogaster* y 8 en *D.subobscura*.

La existencia de los dominios PEST conservados en las dos especies (sólo 1 de los 3 presenta variaciones que no afectan a la estructura del dominio) y de los pares Arg-Arg apoyan la idea de que la proteína *zen* posee secuencias que le confieren una vida media bastante breve, que estimaríamos entre 0.5 y 1 hora.

## 5.2. DE LA COMPARACIÓN DE LAS SECUENCIAS REGULADORAS DE *zerknüllt*

El análisis de secuencias reguladoras mediante la comparación en diversas especies, muestra que la conservación de la secuencia se produce de un modo irregular. Al no ser secuencias codificantes la presión selectiva actuaría con menos intensidad, permitiéndose mayores cambios en la identidad de las bases y, sobre todo, en el número y tamaño de las inserciones y deleciones. Las secuencias reguladoras conservadas aparecen así como islas de homología en medio de regiones poco, o nada, conservadas.

Resultados de este tipo han sido obtenidos por Wilde y Akam (1987) al analizar la región 5' del gen *Ubx*, destacando una secuencia de 118 pb conservada en la mosca doméstica; Hooper y Pérez-Alonso *et al.* (1992), en la región reguladora del gen *Antp*; Fenerijian *et al.* (1989) en el *cluster* de genes coriónicos, en el que encontraron de 15 a 17 copias de un motivo conservado en 4 especies de *Drosophila*; Heberlein y Rubin (1990) en el promotor del gen *rough*, que presentaba un 43% de similitud, pero en el que existían fragmentos de 10 a 16 pb perfectamente conservados; Seeger y Kaufman (1990) en la región promotora de *bcd*; Treier *et al.* (1989) en la región 5' de *hunchback*; Kassis *et al.* (1989) en la región reguladora de *engrailed*; Maier *et al.* en el promotor de *fushi tarazu* (1990).

Los resultados que hemos obtenido al comparar la región reguladora de *zerknüllt* en *D.melanogaster* y *subobscura*, no hacen sino confirmar la tendencia descrita anteriormente. Así, aunque la similitud de la región completa es del orden del 70%, existen fragmentos de hasta 21 pares de bases con una identidad del 100%, mientras que, por otro lado, se han producido numerosas inserciones (348 pb en total) y deleciones (108 pb en total), algunas de gran tamaño, y numerosos cambios en la identidad de las bases.

En todos los casos que hemos mencionado se observa que muchos de los elementos conservados son pequeños, de 6 a 20 pb, y cabría preguntarse hasta qué punto se podría haber llegado por azar a esta situación. Sin embargo, el encontrar un motivo conservado en una región no codificante es un buen indicio de que nos encontramos ante un elemento funcionalmente importante: se calcula que una secuencia específica de 6 pb se encuentra una sola vez en un fragmento de 4000 pb, y la probabilidad de que aparezca en una secuencia aleatoria de 100 pb es de 0,023. Sin embargo, hay que tener especial cuidado al comparar dos secuencias puesto que si no se tiene en cuenta la posición relativa de los motivos que se comparan se pueden incurrir en errores: en 100 pb hay 95 hexanucleótidos posibles, por lo que si hacemos una comparación cruzada de dos secuencias de este tipo, la probabilidad de encontrar un apareamiento perfecto entre dos hexanucleótidos se eleva bastante,  $95 \times 0,023$  (Dickinson, 1991). Por este motivo en este trabajo, y en todos los que estamos manejando, la identificación de los posibles motivos reguladores se ha realizado en base a que la posición que ocupen en la secuencia sea equivalente en las distintas especies, por lo que un correcto alineamiento de las mismas ha sido un paso previo imprescindible.

Una vez identificados los posibles motivos de regulación la cuestión que nos planteamos es la de tratar de determinar la función de cada uno de ellos. Algunos de ellos son fácilmente identificables debido a que responden a factores generales de la transcripción: caja TATA, octámeros, cajas CAAC, etc. En cambio la identificación de la naturaleza de los motivos de regulación particulares de cada gen es mucho más dificultosa. La existencia de bases de datos en los que se recopilan los, cada vez mas numerosos factores de transcripción permite realizar una primera aproximación, aunque los resultados obtenidos siempre habrán de ser comprobados mediante técnicas experimentales. En este trabajo hemos identificado algunas secuencias que, posiblemente, sean capaces de unir factores de transcripción similares a los descritos en la sección 4.6.4. de Resultados, pero, por los motivos citados anteriormente somos conscientes de que nos movemos sobre meras conjeturas.

En otras ocasiones ha sido posible identificar los motivos conservados con elementos reguladores previamente identificados mediante diferentes técnicas: transformación, ensayo de retraso en gel, inmunoprecipitación, protección frente a nucleasas, etc. Este ha sido el caso de los genes *engrailed*, *fushi tarazu* y *Antennapedia*. Kassis *et al.* (1989) al comparar las secuencias de *D.melanogaster* y *D.virilis* identificaron en el promotor de *engrailed* las secuencias diana de las proteínas con homeodominio que lo regulan; Maier *et al.* (1990) comprobaron la conservación en *D.hydei* de los distintos elementos de control descritos en *D.melanogaster* para el gen *fiz* (zebra, neurogenic y *upstream*); Hooper, Pérez-Alonso *et al.* (1992) consiguieron identificar, mediante la comparación con *D.virilis* un sitio unión de *Ubx* sobre el promotor del gen *Antp* (A-A ), previamente identificado mediante experiencias de protección frente a la DNaseI, en cambio el segundo de ellos (A-B) no parecía estar conservado.

La regulación del gen *zerknüllt* ya ha sido estudiada con gran detalle en diferentes trabajos, como ya vimos en la Introducción. El trabajo de Doyle *et al.* (1989), mediante la técnica de microinyección con un gen indicador y diferentes fragmentos del promotor de *zen* identificó 3 regiones diferentes en el mismo, en las que residirían los elementos responsables de los diferentes procesos de regulación. El

dominio de represión ventral se extendía entre -1200 y -1400 y en él se encontraban las secuencias responsables de la represión del gen en la región ventral del embrión. El dominio de activación dorsal, en la región proximal del promotor sería el responsable del mantenimiento de la expresión de *zerknüllt*, mientras que en el dominio de inhibición lateral, que solapaba en gran parte con el anterior, se encontrarían los motivos encargados de la modulación de la expresión. La comparación de las secuencias del promotor en *D.melanogaster* y *D.subobscura* nos permite comprobar la existencia de 2 regiones conservadas que podrían corresponder a los dominios citados anteriormente, si bien el dominio de represión ventral sería de un tamaño sensiblemente superior al indicado por Doyle y colaboradores. Además nosotros podemos proponer algunos motivos que podrían ser los blancos de diferentes factores de transcripción, por lo que en este caso la comparación entre especies demuestra ser una herramienta útil.

La región distal del promotor, el dominio de represión ventral, ha sido sometido a un exhaustivo análisis en diferentes trabajos. Inicialmente se identificaron las secuencias a las que se unía la proteína *dorsal*, que era el factor responsable, directamente, de que la expresión de *zen* quede restringida a la región dorsal del embrión (Ip *et al.*, 1991). Estas secuencias, en número de 4, responden al consenso de unión de la familia NFκB, y la interacción de la proteína *dorsal* con estas secuencias y sus efectos sobre la expresión de diversos genes están ya bien establecidas (Pan y Courey, 1992; Jiang *et al.*, 1992).

Muy recientemente Kirov *et al.* (1993) han aplicado la aproximación evolutiva, obteniendo y comparando la secuencia de la región distal del promotor de las especies *Drosophila melanogaster*, *virilis* y *pseudoobscura*. Los resultados que nosotros hemos obtenido no hacen sino confirmar las conclusiones de Kirov y colaboradores: la región contiene 4 sitios de unión para la proteína *dorsal* (3 en *virilis*), aunque los consensos no está tan bien conservado en las restantes especies como en *D.melanogaster*. En este sentido, el cambio de una G por una T en una posición tan conservada de la secuencia de unión de todas las proteínas de la familia NFκB puede ser bastante significativo.

En este trabajo también se identifican otras secuencias, sobre las que se unirían los factores que actuarían cooperativamente con *dorsal* (que de por sí es un activador) para reprimir la transcripción de *zerknüllt*. En *D.subobscura* también hemos encontrado tales secuencias, ricas en A y T y denominadas AT0 a AT3, situadas al lado de los sitios de unión de *dorsal*. Con un total de 4 especies analizadas podemos proponer un consenso de unión para estos factores, estudiados ya en el trabajo de Jiang *et al.* (1993):

#### WTTYDTTSA

En general, podemos concluir que la comparación de secuencias reguladoras permite identificar las secuencias que potencialmente pueden unir factores de regulación de la transcripción, que serían aquellas conservadas entre las especies analizadas. Sin embargo estos estudios deben ser contemplados con evidencias experimentales de otro tipo, que permitan la confirmación de las dianas identificadas. Este ha sido el caso del estudio de la región distal del promotor de *zerknüllt*, en el que la comparación interespecífica ha servido para identificar nuevos factores que intervienen en la regulación del gen.

### 5.3. LA REGIÓN 3' NO TRADUCIDA DEL GEN *bicoid*, UN PROBLEMA METODOLÓGICO

La región *trailer* del gen *bicoid* ya había sido analizada en profundidad por Macdonald (1992) que realizó la comparación de la misma en siete especies diferentes. Este estudio se había realizado previamente al comparar las secuencias de *D.melanogaster* y *D.pseudoobscura* (Seeger y Kaufman, 1989). En ambos trabajos quedaba claramente establecida la existencia de unos dominios de estructura secundaria del ARNm, que serían fundamentales para el transporte del mismo hacia el oocito de *Drosophila*.

En este aspecto los resultados que hemos obtenido en este trabajo no vienen sino a redundar sobre lo ya descrito anteriormente, puesto que la región 3' no traducida del gen *bcd* de *D.subobscura* presenta las secuencias conservadas en el resto de especies analizadas anteriormente y, probablemente, también sea capaz de formar estructuras secundarias similares, si concedemos fiabilidad a los programas informáticos capaces de calcular tales estructuras. La única diferencia notable podría ser que en *D.subobscura* no existiría un dominio variable entre el I y el II, como el que existe en *D.melanogaster* (Macdonald, 1992). Por ello el número total de dominios en nuestra especie podría ser menor, ya que los dominios I y II aparecen separados por el dominio variable, y en *D.subobscura* no hay motivo para hacer tal división.

Hemos podido comprobar la dificultad que entraña el intentar reproducir estructuras de este tipo, pues el resultado puede ser bien distinto en función del soporte informático utilizado. De hecho las estructuras secundarias determinadas por Seeger y Kaufman (1989), tienen 6 dominios distintos, mientras que las establecidas por Macdonald, contemplan la existencia de 5 dominios estructurales. Al realizar nuestro propio análisis decidimos basarnos en los resultados de Macdonald (1992), realizados en un número de especies mucho mayor y, por lo tanto, mas consistentes. Nosotros no pudimos reproducir exactamente los resultados presentados por Macdonald (1992) para *D.melanogaster*, lo que intentamos como paso previo al estudio de *D.subobscura*. Estas diferencias en la topología de los dominios de estructura secundaria, sólo podían ser achacadas al uso de diferentes programas informáticos y a los algoritmos en los que se basan, lo que, en un principio, nos hizo tomar los resultados con cierta cautela. A pesar de ello, aunque el alineamiento de las secuencias se hizo de un modo independiente al cálculo de la estructura secundaria, al representar esta última sobre el alineamiento múltiple, pudimos comprobar cómo los dominios que habíamos obtenido en *D.subobscura* se situaban en las mismas posiciones que los establecidos por Macdonald (1992)(Fig. 22). Este hecho nos inclina a pensar que nuestros resultados tiene un alto grado de fiabilidad.

El alineamiento de esta región con secuencias de 9 especies diferentes nos ha permitido comprobar la presencia de un motivo conservado descrito por Gottlieb (1992) en los mensajeros que sufren procesos de transporte de unas células a otras. Para nuestra sorpresa, el motivo conservado en mensajeros de diferentes genes (*bicoid*, *nanos*, *An2* y *Vg1*) y especies muy alejadas (*D.melanogaster* y *Xenopus*) y cuya funcionalidad se ha demostrado mediante mutagénesis, presenta diferencias al analizarlo en especies que pertenecen al mismo género. Así en 5 de las 9 especies el este motivo tiene 10 bases en lugar de las 9 descritas por Gottlieb, mientras que el resto del motivo (excepto en *D.virilis*) permanece

invariable, a pesar de que algunas ambigüedades parecen permitidas. Ignoramos si en las 5 especies en las que una T se ha duplicado originando un consenso con 10 pb, el motivo de unión es funcional, aunque el hecho de que el resto se haya conservado tan bien puede ser significativo. En cualquier caso serían necesarias experiencias que demostraran la funcionalidad o no del motivo modificado.

#### 5.4. DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN, DE SU ANÁLISIS Y SU COMPARACIÓN

Ya comentamos en la Introducción cómo la comparación de los patrones de expresión de los genes, bien de sus mensajeros, bien de sus proteínas, durante el desarrollo embrionario podrían aportar indicios sobre la regulación de los mismos. Así, si un gen determinado presentaba el mismo patrón espacial y temporal en las especies analizadas podemos deducir que en todos los casos el sistema de regulación del mismo será muy parecido. Por el contrario, cuando los patrones de expresión presentan diferencias evidentes sería posible pensar que los sistemas de regulación han cambiado (Dickinson, 1992).

Podemos mencionar algunos ejemplos ilustrativos en uno y otro sentido. Treier *et al.* (1989), al caracterizar el gen *hunchback* (*hb*) en *D. virilis* encontraron que aunque el patrón de expresión proteico era básicamente el mismo, la expresión secundaria de la proteína, con una función independiente de la segmentación, presentaba diferencias en las dos especies. Esta divergencia en la función secundaria del gen *hb* podría contribuir a la evolución de los genes reguladores.

Heberlein y Rubin (1990) encontraron que el patrón de expresión en discos imaginales de la proteína *rough*, necesaria para el desarrollo del ojo, era idéntica en *D. melanogaster* y *D. virilis*.

Fjose *et al.* (1993), al caracterizar los genes *svp44* y *svp46* del pez zebra (*Brachydanio rerio*), que son homólogos al gen *seven-up* (*svp*) de *Drosophila*, encontraron que ambos expresaban sus transcritos en los primordios de los rombómeros del sistema nervioso central. Esto era considerado por los autores como la primera evidencia de que algunas de las funciones específicas del gen *svp* de *Drosophila* estaban conservadas en vertebrados.

Mitsialis y Kafatos (1895), comprobaron que los genes que controlan la expresión del corion en *Bombyx mori*, introducidos en *Drosophila* mediante transformación se expresaban con un patrón idéntico al de los propios genes de *Drosophila* por lo que su sistema de regulación debía estar conservado en grupos tan lejanos como la mosca y la polilla.

Kelsh *et al.* (1993) estudiaron la expresión del homólogo del gen *Abdominal-B* de *Drosophila* en el saltamontes *Schistocerca gregaria*. En *Drosophila* el gen *Abd-B*, que puede producir dos variantes proteicas de diferente tamaño, *Abd-B m* y *Abd-B r*. En este trabajo se pudo comprobar que el patrón de expresión proteico de *S. gregaria* reproducía únicamente el de la forma *Abd-B r*, de menor tamaño que a otra; a pesar de ello la especificidad tisular de este gen se había mantenido en ambas especies.

Recientemente, Bomze y López (1993) ha analizado y caracterizado molecularmente fragmentos del gen *Ultrabithorax* de *D. melanogaster*, *D. pseudoobscura*, *D. hydei* y *D. virilis*. Al estudiar el patrón de expresión tisular de las diferentes variantes proteicas codificadas por *Ubx* (produce hasta 6 variantes distintas) éste resultó ser idéntico en todas las especies. Esto indica que la regulación, durante el desarrollo, de los sucesos de *splicing* alternativo se han conservado, por lo que este procesado alternativo, que origina las diferentes variantes proteicas debe tener alguna función importante durante el desarrollo.

Nuestro caso se enmarca muy bien entre los trabajos anteriores, pues el patrón de expresión de los mensajeros del gen *zerknüllt* es igual en *D.melanogaster* y *D.subobscura*. Esto podría significar que ambos genes están regulados por un sistema idéntico, y que su función es lo bastante importante como para que este sistema se haya mantenido invariable durante la evolución.

Mención especial merece el patrón de expresión que, por primera vez en detalle, hemos descrito en las células polares. Rushlow *et al.* (1987) son los primeros autores que reseñan la presencia de mensajeros del gen *zerknüllt* en una subpoblación de las células polares. Posteriormente, Doyle *et al.* (1989), al estudiar la distribución de la proteína *zen* durante el desarrollo embrionario vuelven a describir un conjunto de células polares en la que se detecta la presencia de esta proteína. No se ha descrito ninguna mutación de *zen* que afecte a la formación de las células polares, por lo que se desconoce qué función puede desempeñar este gen en las mismas. El hecho de que ésta expresión también se produzca en *D.subobscura*, en una subpoblación de células similar, parece indicar, sin embargo, que esta función podría tener cierta relevancia, por lo que ésta se ha conservado.

El hecho de no haber encontrado mutantes *zen* que afecten a las células polares puede deberse a que los alelos existentes hasta ahora afectan tan dramáticamente al embrión, impidiendo la extensión de la banda germinal y alterando enormemente su estructura, que no sea posible apreciar el efecto de este gen sobre las células polares, pues éste podría aparecer en estadios posteriores. Sería necesaria una búsqueda sistemática de mutaciones *zen* que afecten a las células polares y no al desarrollo del eje dorsoventral (si ello es posible), para poder aventurar alguna hipótesis sobre la función de *zen* en estas células.

En nuestro análisis de la expresión de los transcritos de *zen* hemos encontrado un patrón no descrito hasta ahora, que corresponde al período de modulación de la expresión del mismo, cuando *zen* reduce su expresión a la futura amnioserosa. Aportamos evidencias de que, al menos durante ese período, el patrón de expresión adopta una apariencia segmentada, siendo apreciables 7 bandas discretas a lo largo del embrión, que ocupan la parte dorsal del mismo y que posteriormente desaparecen. Este patrón temporal indicaría que en la modulación de la actividad de este gen podría intervenir, directa o indirectamente, alguno de los genes de segmentación del tipo *pair rule*. No se han descrito interacciones directas entre los genes de segmentación y *zen*, aunque no se ha hecho ningún estudio exhaustivo sobre el tema y tampoco hemos encontrado ninguna secuencia sobre el promotor de *zen* que pudiera ser capaz de unir alguna de las proteínas producidas por los genes de segmentación. Sin embargo, la existencia de este patrón podría abrir nuevas vías para el estudio de la regulación de *zerknüllt*, que de momento está centrado en el análisis de la expresión dorsal controlada por el gen *dorsal*, mientras que otros aspectos, como el de la activación inicial o el de la modulación de la expresión, continúan sin ser demasiado conocidos.



### 5.5 EL COMPLEJO ANTENNAPEDIA DE *D.subobscura*

A la hora de elaborar la discusión sobre la estructura del complejo Antennapedia de *D.subobscura* (sbANT-c) nos encontramos con la gran limitación de poseer, en su mayor parte, datos parciales. Por este motivo, las conclusiones a las que podamos llegar estarán siempre pendientes de una posterior confirmación, que llegará cuando se complete la caracterización molecular del complejo en esta especie.

Ahora bien, poseemos suficientes elementos de juicio para poder afirmar que el ANT-C de *D.subobscura* puede presentar algunos cambios sustanciales respecto de lo encontrado en *D.melanogaster* (Kaufman *et al.*, 1990) y *D.pseudoobscura* (Randazzo *et al.*, 1993), las únicas especies en las que este complejo se ha caracterizado en su totalidad. Estos cambios no afectarían tanto al orden de los genes en el complejo, conservado en la escala evolutiva, como a las distancias existentes entre ellos y a la orientación del complejo sobre el cromosoma. En este sentido son 2 los puntos sobre los que podemos aportar algunos datos: la presencia del gen *z2*, la organización y orientación del complejo en el cromosoma O.

#### 5.5.1. EL GEN *z2* EN *D.subobscura*

Cuando se describió en detalle la estructura molecular de la región *zerknüllt* del ANT-C de *D.melanogaster* (Rushlow *et al.*, 1987), se pudo comprobar la existencia de dos unidades de transcripción, *zen* y *z2*. Ambos genes, como ya hemos comentado repetidas veces, presentaban una *homeobox* similar (70% de similitud) y sus mensajeros tenían unos patrones de distribución espacial y temporal casi idénticos. Los datos disponibles indicaban, en cambio, que solamente *zen* era suficiente para realizar la función *zerknüllt* durante el desarrollo. El origen y función propios de *z2* quedaba sin resolver, aunque Rushlow *et al.* (1987) ya propusieron que este gen podría haber surgido de *zen* y estaría en proceso de adquirir una nueva función.

Un caso similar se había descrito anteriormente, con los genes *invected* y *engrailed* (Coleman *et al.*, 1987). Aquí la función genética correspondiente la realizaba *engrailed*, mientras que la de *invected* permanecía desconocida. En este caso las proteínas codificadas por ambos genes eran casi idénticas, mientras que en el caso de *zen* y *z2*, fuera de la *homeobox* la similitud no era significativa. Con estos datos se podría pensar que, si *invected* y *z2* habían surgido por la duplicación de *engrailed* y *zerknüllt*, ésta habría sido mucho más reciente en el caso de *inv* y *en*, por lo que su secuencia apenas habría empezado a cambiar.

Randazzo *et al.* (1993) han caracterizado recientemente, a nivel molecular, el complejo Antennapedia de *D.pseudoobscura*, psANT-C, y han encontrado que *z2* no está presente en el complejo, y apuntan la posibilidad de que tampoco se encuentre en el resto del genoma. Este dato apoyaría la idea expuesta anteriormente, que propone a *z2* como un gen que está adquiriendo una función nueva en *D.melanogaster*. Para demostrar este extremo habría que confirmar primero que *z2* habría aparecido de *novo* en *D.melanogaster*, frente a la posibilidad de que hubiera desaparecido en *D.pseudoobscura*. Así la determinación de la presencia, o ausencia, de *z2* en otras especies del género, ayudaría en gran medida a la comprensión de la evolución de los genes *zen* y *z2*.

Estos son todos los datos disponibles hasta el momento, pues, aunque los complejos de genes homeóticos han sido descritos en muchas otras especies (Introducción 1.2.), debemos recordar que todos ellos carecen de *genes accesorios* como *zen*, *bcd* o *ftz*, que, por el momento parecen ser propios de *Drosophila*. Por este motivo, la dilucidación de este problema evolutivo deberá resolverse analizando en profundidad el mayor número posible de especies de este género.

El análisis de la región *zerknüllt* del sbANT-c, que planteábamos como uno de los objetivos de este trabajo, podría aportar evidencias fundamentales a este respecto. Puesto que *D.subobscura* y *D.pseudoobscura* pertenecen al mismo grupo dentro del género *Drosophila*, el grupo *obscura*, el determinar la presencia de *z2* en *D.subobscura* nos permitiría conocer si la ganancia, o pérdida, de *z2* se produjo antes o después de la separación de los grupos *melanogaster* y *obscura*. Si *z2* se encontraba en el genoma de *D.subobscura* sería más fácil suponer que éste se había perdido en *D.pseudoobscura*. Si, por el contrario, *z2* no estuviera presente en *D.subobscura* las posibilidades estaban más abiertas, puesto que *z2* podría haberse perdido en el grupo *obscura*, con lo que debería estar presente en el resto de especies del grupo *melanogaster*, o podría haber aparecido por duplicación en el ancestro que originó este último grupo, por lo que *z2* también debería encontrarse en todas sus especies. Finalmente, si *z2* solo se encontrara en *D.melanogaster*, y para ello se deberían analizar las restantes especies de su grupo, sería probable que el gen hubiera aparecido únicamente en esta especie mediante la duplicación de *zerknüllt*.

Desafortunadamente no podemos aportar datos concluyentes sobre la presencia de *z2* en el genoma de *D.subobscura*, a pesar de haber intentado aproximaciones muy diversas. Sin embargo, disponemos de un conjunto de datos, que de un modo indirecto apuntan la posibilidad de que, al igual que en *D.pseudoobscura*, *z2* no está ni en el ANT-C ni tampoco en el genoma de *D.subobscura*. Estos datos proceden del rastreo realizado con el gen *z2* como sonda, de los análisis de DNA genómico realizados mediante *Southern blot* y del paseo cromosómico realizado a partir del gen *zerknüllt* hacia el gen *proboscipedia*.

En el rastreo sobre la genoteca de *D.subobscura* con una sonda de *z2* no obtuvimos ningún clon que pudiéramos identificar como portador de secuencias homólogas a este gen. Evidentemente esto no significa que *z2* no se encuentre en el genoma de la especie, pues podría haber divergido tanto que no fuéramos capaces de detectarlo en las condiciones usadas. A este respecto podemos hacer varias consideraciones, pues aunque el rastreo se realizó con un fragmento 3' de *z2*, que no llevaba la *homeobox* y que, en principio, no presentaba similitud alguna con el gen *zerknüllt*, todos los clones que obtuvimos contenían, sin embargo, el gen *zerknüllt* de *D.subobscura*. En el rastreo de la librería se empleó como sonda un fragmento electroeluido a partir de un gel de agarosa, por lo que habría sido posible arrastrar contaminación del resto del gen y en concreto de la *homeobox*. La similitud existente entre las *homeobox* de *zen* y *z2*, y el hecho de que este motivo es idéntico en el gen *zerknüllt* de *D.melanogaster* y *D.subobscura*, serían suficientes motivos para justificar esta hibridación cruzada. Ahora bien, si esa contaminación fue suficiente para que en las condiciones usadas detectáramos los clones de *zerknüllt*, ¿cómo justificamos el que no apareciera ninguno con las secuencias homólogas a *z2*? Si este gen se encontrara en *D.subobscura* sería de esperar que al menos su *homeobox* fuera más

parecida a la de su homólogo que a la de *zerknüllt* y por lo tanto deberíamos haberla detectado en el rastreo.

En este punto queremos señalar que el rastreo de la genoteca se realizó sobre 100.000 clones del fago  $\lambda$ , número más que suficiente para que todo el genoma de *D.subobscura* esté bien representado. También hemos de señalar que en los rastreos realizados hasta el momento en éste y en otros trabajos con sondas procedentes de *D.melanogaster* siempre hemos encontrado un número similar de clones con secuencias homólogas a las de la sonda utilizando unas condiciones de lavado similares (50°C y 0.5xSSC), lo que es un indicio de que la librería está bien representada. Como ejemplo podemos citar los rastreos llevados a cabo con las sondas de los genes *Antennapedia* (Hooper y Pérez Alonso, 1992), *bcd* (datos no presentados), *zerknüllt*, *proboscipedia* y *labial*, en los que el número de clones obtenido ha sido siempre similar.

Todo lo dicho hasta ahora nos lleva concluir que el hecho de no haber encontrado secuencias homólogas a *z2* en el rastreo de la genoteca de *D.subobscura* podría ser considerado como un indicio de que el gen no se encuentre en esta especie, aunque no podamos considerarlo como una prueba definitiva.

La interpretación de los *Southern blot* de DNA genómico es bastante compleja, debido a la existencia de numerosas bandas inespecíficas que se repiten en los filtros hibridados con las diferentes sondas. Puesto que no hemos podido concluir nada concreto a partir de los datos no incidiremos demasiado sobre ellos. Sólo apuntaremos el hecho de que al utilizar como sonda los cDNAs completos de ambos genes hemos podido identificar bandas que por su intensidad y su tamaño corresponden al gen *zerknüllt* de *D.subobscura*, mientras que para *z2* esto no ha sido posible (aunque no podemos descartar su existencia). Problemas similares se les plantaron a Randazzo *et al* (1993) cuando realizaron un análisis similar sobre *D.pseudoobscura*, por lo que no podían descartar del todo que alguna de las señales que obtenían en los filtros no correspondiese, al menos, a un gen similar a *z2*.

El camino más directo para demostrar la existencia del gen *z2* en el complejo *Antennapedia* es, sin duda, la clonación de toda la región existente entre los genes adyacentes, en este caso *zerknüllt* y *proboscipedia*, y la comprobación, mediante hibridación, de la presencia de secuencias homólogas a *z2*. Por este motivo iniciamos un paseo cromosómico desde el gen *zerknüllt* hacia el gen *proboscipedia* (tras asegurarnos de que este gen sí que existía en *D.subobscura*), con la esperanza de hallarlo a una distancia aproximadamente igual que la que existe en *D.melanogaster* y, sobre todo, en *D.pseudoobscura*. Debido a las particularidades que debe tener el sbANT-C no hemos podido concluir el paseo cromosómico, a pesar de que ya hemos avanzado 45 Kb, mas de 4 veces la distancia entre *pb* y *zen* en las dos especies analizadas hasta ahora. No sabemos cuánta distancia existe realmente entre ambos genes, aunque dada su situación citológica esperamos que no sea mucho mayor. De momento, hasta que el paseo cromosómico se lleve a término, poseemos datos parciales: no hemos podido detectar secuencias homólogas a *z2* en las 45 Kb que hasta ahora tenemos caracterizadas; tampoco lo hemos conseguido encontrar en ninguno de los clones obtenidos en el rastreo llevado a cabo con *proboscipedia*, por lo que podemos deducir que *z2* no está contiguo a *pb* (como ocurre en *D.melanogaster*). Pero, puesto que aún no poseemos la región completa entre *zen* y *pb*, no podemos establecer de modo concluyente que *z2* está ausente de la misma.

Podemos ver cómo todos los indicios que tenemos apuntan hacia la posibilidad de que *z2* no esté presente en el genoma de *D.subobscura*, aunque aún deben aportarse más datos que lo confirmen. Si esto ocurre finalmente, habría que analizar la existencia de *z2* en otras especies del grupo *melanogaster* y confirmar así si el suceso evolutivo que tuvo lugar fue la pérdida del gen en el grupo *obscura* o la ganancia del mismo en el grupo *melanogaster*.

### 5.5.2. ESTRUCTURA Y ORIENTACIÓN DEL sbANT-C

Como resultado de la búsqueda del gen *z2* en la región comprendida entre los genes *zen* y *pb* iniciamos un paseo cromosómico en esa región y como ya hemos visto, pudimos comprobar que la distancia entre estos genes era mucho mayor en *D.subobscura* que en *D.melanogaster* y *D.pseudoobscura*. Tras haber avanzado 45 Kb todavía no hemos podido conectar ambos genes, por lo que la región intergénica es como mínimo 4 veces superior a la del complejo de las otras dos especies.

Esta diferencia podría resultar sorprendente, puesto que en la comparación de los ANT-C de *D.melanogaster* y *D.subobscura* se podía comprobar cómo las distancias entre los genes se habían mantenido, y éstas no presentaban una diferencia de tamaño superior al 10%. Incluso la región entre *pb* y *zen*, que podría estar alterada por la presencia (o ausencia) de *z2*, permanecía casi invariable. Tenemos que recordar que la estructura del complejo en la región *bcd-zen* está conservada en *D.subobscura*, habiéndose conservado tanto la orientación como la distancia física entre ambos genes. Por ello el haber no haber encontrado el gen *proboscipedia* en la región clonada nos hizo pensar en la posibilidad de que se hubiese producido alguna inversión cromosómica que habría alterado la organización del complejo. Para comprobar este punto realizamos las hibridaciones *in situ* sobre los cromosomas de *D.subobscura*, que nos permitió comprobar que ambos genes se encuentran en la misma posición cromosómica, además de sugerir una nueva diferencia del sbANT-C respecto del de *D.melanogaster*, lo que comentaremos más adelante.

El haber encontrado esta notable diferencia en la organización del complejo podría sugerir que las distancias entre los miembros de los HOM-C no serían determinantes para la regulación de los mismos. Una vez más el caso de *Drosophila* se presenta diferente respecto del resto de organismos en los que se han descrito complejos de genes homeóticos, pues mientras que los HOM-C de vertebrados tienen una longitud media de 100 Kb (McGinnis y Krumlauf, 1992), el ANT-C de *Drosophila* ocupa 300 Kb, y uno de sus genes, *Antennapedia* ya se extiende más de 100 Kb (Kaufman *et al.*, 1990). Este primer y provisional dato sobre el ANT-C de *D.subobscura* podría sugerir la existencia de otras alteraciones en el mismo. En este sentido, conocemos la localización citológica de los genes que ocupan los extremos del complejo, *Antp* y *lab*, y el hecho de que ambos genes estén separados por una banda de gran grosor podría sugerir que la longitud total del complejo en esta especie podría ser muy superior a la de las demás especies.

En cualquier caso, contamos sólo con datos parciales, que será necesario completar antes de poder sacar alguna conclusión respecto de la trascendencia de las distancias intergénicas en la regulación de los genes del complejo.

Los datos de localización citológica obtenidos nos permiten afirmar que el complejo *Antennapedia* de *D.subobscura* se encuentra invertido en su posición cromosómica respecto a *D.melanogaster*. Esta afirmación se basa en el hecho de que conocemos la localización cromosómica de los genes *Antp*, *bcd*, *zen*, *pb* y *lab*, y si el orden de los genes se ha mantenido en el complejo (y de momento no tenemos motivos para dudarlo), la posición de los genes que ocupan los extremos del mismo, *lab* y *Antp* debe ser determinante para conocer la orientación del complejo respecto del centrómero. Así mientras que en *D.melanogaster* el gen *labial* sería el más próximo al centrómero del cromosoma 3 y *Antennapedia* el más próximo al telómero; en *D.subobscura* la situación sería la contraria, de modo que sería ahora *Antp* el gen más próximo al centrómero y *lab* el más cercano al telómero del cromosoma O.

Aquí chocamos de nuevo con la ausencia de datos procedentes de otras especies, pues aunque se conoce los cromosomas en los que se encuentran los diferentes HOM-C descritos, nada se dice de su posición en el mismo ni, mucho menos, de su orientación respecto al centrómero (Doboule y Dollé, 1989; Lobe y Gruss, 1990; Bonincelli *et al.*, 1989; Dekker *et al.*, 1992; Ross y Tanaka, 1989; Beeman *et al.*, 1993 y Bürglin; Ruvkun, 1993 y Terol *et al.*, 1991).

Consideramos que este dato novedoso puede aportar alguna luz respecto a la correlación de la posición de los genes en el complejo y sus dominios de expresión a lo largo del eje anteroposterior del embrión, señalada en todos los HOM-C descritos hasta el momento (revisado por McGinnis y Krumlauf, 1992). Así nuestros datos sugerirían que lo realmente importante sería el orden de unos genes respecto a otros dentro del complejo, sin que la orientación del mismo respecto al centrómero resultara determinante.

La hipótesis comúnmente aceptada para explicar la extraordinaria conservación del orden de los diversos homólogos de los genes homeóticos en sus respectivos complejos, mantiene que, la existencia de elementos reguladores situados a lo largo de todo el complejo, es la causa más inmediata de que estos genes hayan mantenido su organización de un modo tan invariable. Así el cambio en la posición de uno de estos genes provocaría la desregulación del complejo entero, por lo que estos cambios no serían permitidos durante la evolución (Akam, 1989). La correlación entre la posición y dominios de expresión de los genes, además de que en vertebrados todos los genes tenían la misma orientación 5'-3', parecía corroborar esta idea. Además existían algunas evidencias en este sentido, ya que se había descrito que los elementos reguladores del complejo HOX de ratón estarían interdispersos entre los genes que lo componen (McGinnis y Krumlauf, 1992). En *Drosophila*, los procesos reguladores entre los propios genes homeóticos también apoyaban esta idea (Akam 1989).

Por otro lado, también en *Drosophila*, aparecían evidencias que indicaban que la organización de los HOM-C no tenía que ser necesariamente tan rígida. Así se había descrito que el gen *fushi tarazu* se encontraba invertido en *D.virilis* respecto *D.melanogaster* (Maier *et al.*, 1990) y lo mismo ocurría con *labial* en *D.pseudoobscura*, cuya orientación 5'-3' era la contraria de la que tenía en *D.melanogaster* (Randazzo *et al.*, 1993). Nuestros datos indicarían, además, que lo determinante sería la organización interna del complejo, sin que importara demasiado cómo se sitúa éste sobre el cromosoma.

Como conclusión final de este punto podríamos señalar que lo realmente conservado en los complejos homeóticos es el hecho de la colinearidad entre el orden de los genes dentro del complejo y

sus dominios de expresión a lo largo del eje anteroposterior del embrión. Otros aspectos como el número de genes, la dirección de la transcripción, el tamaño y espaciado de los genes, e incluso la orientación o las distancias entre ellos, podrían estar sujetos a una mayor variabilidad, sin que las ventajas evolutivas que pudiera presentar tal colinearidad se perdieran. Todavía no se conoce claramente cuales podrían ser tales ventajas, pero el hecho de que la evolución haya conservado tal organización sugiere firmemente su existencia (Randazzo *et al.*, 1993).





## ***5. CONCLUSIONES***





1. El análisis molecular de la región codificadora del gen *zerknüllt* de *D.subobscura* demuestra la presencia de regiones conservadas y regiones variables. Las regiones conservadas, como la *homeobox*, pueden representar los dominios funcionales de la proteína. Las regiones variables, que pueden corresponder a regiones sin importancia funcional, se originan mediante un sistema de pérdida y recuperación de la pauta de lectura, que no hemos encontrado en otros genes de desarrollo analizados.

2. El análisis comparativo de la región promotora confirma la existencia de dos dominios conservados, proximal y distal, en el que deben encontrarse los elementos reguladores del gen *zerknüllt*. Hemos identificado las secuencias diana del gen *dorsal*, situadas en sitios equivalentes a los del promotor del gen en *D.melanogaster*, lo que sugiere que la represión de *zen* por *dorsal* es un fenómeno conservado; también hemos identificado secuencias conservadas que pueden corresponder a otros elementos reguladores, tanto de tipo general como específicos de este gen. La conservación de la región corresponde a la encontrada normalmente en zonas reguladoras: motivos muy conservados inmersos en otras secuencias de gran variabilidad.

3. El estudio del patrón de expresión de los mensajeros *zen* en *D.melanogaster* no ha aportado ninguna diferencia significativa respecto al de *D.melanogaster*, lo que podría indicar que el sistema de regulación de este gen se ha conservado durante la evolución.

4. Hemos descrito con detalle la expresión del gen *zerknüllt* en una subpoblación de las células polares durante el desarrollo embrionario de *D.melanogaster* y *D.subobscura*, lo que indica que, a pesar de que no se hayan descrito efectos mutantes de *zen* sobre estas células, la función de este gen en tales células ha de tener cierta relevancia.

5. Describimos, por primera vez, una fase transitoria de expresión en bandas del gen *zerknüllt*, tanto en *D.melanogaster* como en *D.subobscura*, lo que podría sugerir la interacción de *zen* con algún gen de segmentación.

6. La disposición de los genes *zerknüllt* y *bicoid* está conservada en el ANT-C de *D.subobscura*, la distancia de ambos genes es similar y su orientación es la misma que en *D.melanogaster* y *D.pseudoobscura*.

7. La región 3' no traducida del gen *bicoid* de *D.subobscura* presenta una conservación elevada, siendo posible que forme las estructuras secundarias necesarias para el transporte del mensajero *bicoid*.

8. La distancia del gen *zerknüllt* al gen *proboscipedia*, del que hemos aislado secuencias homólogas en la especie objeto de nuestro análisis, es superior a 45 kb, al menos 4 veces mayor que la encontrada en *D.melanogaster* y *D.subobscura*.

9. Diversas evidencias indican que el gen *z2* está ausente del genoma de *D.subobscura*, aunque carecemos de suficientes datos para precisar este punto con total certeza.

10. Hemos determinado la posición citológica del ANT-C de *D.subobscura*, que abarca de la subsección 80B hasta la 80D del cromosoma O de esta especie.

11. El complejo Antennapedia de *D.subobscura* está orientado respecto al centrómero del cromosoma de modo inverso al que lo está en *D.melanogaster*. Esto podría indicar que lo realmente importante en los complejos de genes homeóticos es que se conserve la posición relativa de unos genes respecto a otros, sin que la orientación del complejo dentro del cromosoma sea determinante.

## *7.BIBLIOGRAFÍA*



- AGUADE, M. (1988). Nucleotide sequence comparison of the *rp49* gene region between *Drosophila subobscura* and *D. melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* 5(4): 433-441.
- ALBERGA, A., BOULAY, J.L., KEMPE, E., DENNEFELD, C., HAENLIN, M. (1991). The *snail* Gene Required for Mesoderm Formation in *Drosophila* Is Expressed Dynamically in Derivatives of All Three Germ Layers. *Development* 111: 983-992.
- ANDERSON, K-V., BOKLA, L., NÜSSLEIN-VOLHARD, C. (1985b). Establishment of Dorsal-Ventral Polarity in the *Drosophila* Embryo: The Induction of Polarity by the *Toll* gene product. *Cell* 42: 791-798.
- ANDERSON, K. V. AND C. NÜSSLEIN-VOLHARD. (1984). Information for the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* 311: 223-227.
- ANDERSON, K. V. Dorsal-ventral embryonic pattern genes of *Drosophila*. (1987). *TIG* 3: 91-97.
- ANDERSON, K.V., JÜRGENS, G., NÜSSLEIN-VOLHARD, C. (1985a). Establishment of dorsal-ventral polarity in *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the *Toll* gene product. *Cell* 42: 779-789.
- ATHERTON, D. Y GALL, J. (1972). Salivary gland squashes for *in situ* nucleic acids hybridization studies. *D. I. S.* 49: 131-133.
- AUSUBEL, F. M., BRENT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SEIDMAN, J. G., SMITH, J. A. Y STRUHL, K. (1988). *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley-Interscience.
- BEACHY, P.A. (1990). A Molecular View of the *Ultrabithorax* Homeotic Gene of *Drosophila*. *TIG* 6: 46-51.
- BEEMAN, R.W., JEFFREY, J.S., BROWN, S.J., DENELL, R.E. (1993). Structure and Function of the Homeotic gene Complex (HOM-C) in the Beetle, *Tribolium Castaneum*. *Bioessays* 15: 439-444.
- BENTON, W. D. Y DAVIS, R. W. (1977). Screening  $\lambda$ gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* 196, 180.
- BERLETH, T., M. BURRI, G. THOMA, D. BOPP, S. RICHSTEIN, G. FRIGERIO, M. NOLL. AND C. NÜSSLEIN-VOLHARD. (1988). The role of localization of *bicoid* RNA in organizing the anterior pattern of the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* 7: 1749-1756.
- BERMINGHAM, J. R. AND M. P. SCOTT. (1988). Developmentally regulated alternative splicing of transcripts from the *Drosophila* homeotic gene *Antennapedia* can produce four different proteins. *EMBO J.* 7: 3211-3222.

- BIER, E., JAN, L.Y., JAN, Y.N. (1990). *rhomboid*, a Gene Required for Dorsoventral Axis Establishment and Peripheral Nervous System Development in *Drosophila-melanogaster*. **GENES & DEVELOPMENT** 4: 190-203.
- BODMER, R. (1993). The gene *tinman* is required for specification of the heart and visceral muscles. in *Drosophila*. **Development** 118: 719-729.
- BODMER, R., JAN, L.Y., JAN, Y.N. A. (1990). New Homeobox-Containing Gene, *msh-2*, Is Transiently Expressed Early During Mesoderm Formation of *Drosophila*. **Development** 110: 661.
- BONCINELLI, E., ACAMPORA, D., PANNESSE, M., DESPOSITO, M., SOMMA, R., GAUDINO, G., STORNAIUOLO, A., CAFIERO, M., FAIELLA, A., SIMEONE, A. (1989). Organization of Human Class-I Homeobox Genes. **Genome** 31: 745-756.
- BOULAY, J. L., C. DENNEFELD AND A. ALBERGA. (1987) The *Drosophila* Developmental gene *snail* encodes a protein with nucleic acid binding fingers. **Nature** 330: 395-398.
- BÜRGLIN, T., RUVKUN, G. The *Caenorhabditis elegans* homeobox gene cluster (1993). **Current Opinion in Genetics and Development** 3: 615-620.
- CAMPOS-ORTEGA, J. A. AND V. HARTENSTEIN. (1985). The embryonic Development of *Drosophila melanogaster*. Springer Verlag. Berlin.
- CASANOVA, J. (1991). Interaction Between *Torso* and *dorsal*, Two Elements of Different Transduction Pathways in the *Drosophila* Embryo. **Mech. Develop.** 36: 41-45.
- CHASAN, R., ANDERSON, K.V. (1989). The Role of *easter*, an Apparent Serine Protease, in Organizing the Dorsal - Ventral Pattern of the *Drosophila* Embryo. **Cell** 56: 391-400.
- COLEMAN, K. G., S. J. POOLE, M. P. WEIR, W. C. SOELLER AND T. KORNBERG. (1987). The *invected* gene of *Drosophila*: sequence analysis and expression studies reveal a close kinship to the engrailed gene. **Genes & Development** 1: 19-28.
- CRIBBS, D.L., PULTZ, M.A., JOHNSON, D., MAZZULLA, M., KAUFMAN, T.C. (1992). Structural Complexity and Evolutionary Conservation of the *Drosophila* Homeotic Gene *proboscipedia*. **EMBO J.** 11: 1437-1449.
- DEKKER, E.J., PANNESSE, M., HOUTZAGER, E., BONCINELLI, E., DURSTON. (1993). A Colinearity in the *Xenopus-laevis* Hox-2 Complex. **Mech. Develop.** 40: 3-12.
- DELOTTO, R. AND P. SPIERER. (1986). A gene required for the specification of dorsal-ventral pattern in *Drosophila* appears to encode a serine protease. **Nature** 323: 688-692.
- DICKINSON, W.J. (1991). The Evolution of Regulatory Genes and Patterns in *Drosophila*. **Evolutionary Biology** 25: 127-173.
- DIEDERICH, R.J., PATTATUCCI, A.M., KAUFMAN, T.C. (1991). Developmental and Evolutionary Implications of *labial*, *Deformed* and *engrailed* Expression in the *Drosophila* Head. **Development** 113: 273.

- DOYLE, H. J., K. VOLHARDING, T. HOEY AND M. LEVINE. (1986). Transcripts encoded by a homeobox gene are restricted to dorsal tissues of *Drosophila* embryos. *Nature* 323: 76-79.
- DOYLE, H.J., KRAUT, R., LEVINE, M. (1989). Spatial Regulation of *zerknüllt* - A Dorsal-Ventral Patterning Gene in *Drosophila*. *Genes & Development* 3: 1518-1533.
- DUBOULE, D. AND P. DOLLÉ. (1989). The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* homeotic genes. *EMBO J.* 8: 1497-1505.
- FEINBERG, A. Y GESTEIN, B. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132. 6-13.
- FERGUSON, E.L., ANDERSON, K.V. (1991). Dorsal-Ventral Pattern Formation in the *Drosophila* Embryo - The Role of Zygotically Active Genes. *Current Topics in Development* 25: 17-43.
- FERGUSON, E.L., ANDERSON, K.V. (1992a). *decapentaplegic* Acts as a Morphogen to Organize Dorsal-Ventral Pattern in the. *Drosophila* Embryo. *Cell* 71: 451-461.
- FERGUSON, E.L., ANDERSON, K.V. (1992b). Localized Enhancement and Repression of the Activity of the TGF-beta Family Member, *decapentaplegic*, Is Necessary for Dorsal-Ventral Pattern Formation in the *Drosophila* Embryo. *Development* 114: 583-597.
- FRISCHAUF, A. M., LEHRACH, H., POUSTKA, A. Y MURRAY, N. (1983).  $\lambda$  replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* 170, 827-842.
- GAY, N.J., KEITH, F.J. (1990). *Drosophila* Toll and IL-1 Receptor. *Nature* 351: 355-356.
- GAY, N.J., KEITH, F.J. (1991). Formation of a Gradient of the *Drosophila* Dorsal Morphogen by Differential Nuclear Localisation. *Bioessays* 12: 181-182.
- GONZALEZ-CRESPO, S., LEVINE, M. (1993). Interactions between *dorsal* and helix-loop-helix proteins initiate the differentiation of the embryonic mesoderm and neuroectoderm in *Drosophila*. *Genes & Development* 7: 1703-1713.
- GOTTLIEB, E. (1992). The 3' Untranslated Region of Localized Maternal Messages Contains a Conserved Motif Involved in messenger RNA Localization. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7164-7168.
- GRAHAM, A., N. PAPALOPULU AND ROBB KRUMLAUF. (1989). The Murine and *Drosophila* homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell* 57: 367-378.
- HAN, K., LEVINE, M.S., MANLEY, J. (1989). Synergistic Activation and Repression of Transcription by *Drosophila* Homeobox. Proteins. *Cell* 56: 573-583.
- HANAHAN, D. (1983). Studies on transformation of *E. coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- HASHIMOTO, C., GERTTULA, S., ANDERSON, K.V. (1991). Plasma Membrane Localization of the Toll Protein in the Syncytial *Drosophila* Embryo - Importance of Transmembrane Signaling for Dorsal Ventral Pattern Formation. *Development* 111: 1021.



- HASHIMOTO, C., K. L. HUDSON AND K. V. ANDERSON. (1988). The *Toll* gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52: 269-279.
- HEBERLEIN, U., RUBIN, G.M. (1990). Structural and Functional Comparisons of the *Drosophila virilis* and *Drosophila melanogaster rough* Genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5916-5920.
- HENIKOFF, S. (1984). Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* 28, 351-359.
- HOFFMANN, F. M. AND W. GOODMAN. (1987). Identification in transgenic animals of the *Drosophila decapentaplegic* sequences required for embryonic dorsal pattern formation. *Genes & Development* 1: 615-625.
- HOOPER, J.E., PEREZ-ALONSO, M., BIRMINGHAM, J.R., PROUT, M., ROCKLEIN, B., WAGENBACH, M., EDSTROM, J.E., DE FRUTOS, R., SCOTT, M.P. (1992). Comparative Studies of *Drosophila Antennapedia* Genes. *Genetics* 132: 453-469.
- HUANG, J.D., SCHWYTER, D.H., SHIROKAWA, J.M., COUREY, A.J. (1993). The Interplay Between Multiple Enhancer and Silencer Elements Defines the Pattern of Decapentaplegic Expression. *Genes & Development* 7: 694-704.
- IP, Y.T., KRAUT, R., LEVINE, M., RUSHLOW, C.A. (1991). The dorsal Morphogen Is a Sequence-Specific DNA-Binding Protein That Interacts with a Long-Range Repression Element in *Drosophila*. *Cell* 64: 439-446.
- IP, Y.T., PARK, R.E., KOSMAN, D., BIER, E., LEVINE, M. (1992a). The dorsal gradient morphogen regulates stripes of *rhomboid* expression in the presumptive neuroectoderm of the *Drosophila* embryo. *Genes & Development* 6: 1728-1739.
- IP, Y.T., PARK, R.E., KOSMAN, D., YAZDANBAKHSH, K., LEVINE, M. (1992b) *dorsal-twist* Interactions Establish *snail* Expression in the Presumptive Mesoderm of the *Drosophila* Embryo. *Genes & Development* 6: 1518-1530.
- IRISH, V. F. AND W. M. GELBART. (1987). The *decapentaplegic* gene is required for dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo. *Genes & Development* 1: 868-879.
- JIANG, J., CAI, H., ZHOU, Q., LEVINE, M. (1993). Conversion of a *dorsal*-dependent silencer into an enhancer evidence for *dorsal* corepressors. *EMBO J.* 12: 3201-3209.
- JIANG, J., KOSMAN, D., IP, Y.T., LEVINE, M. (1991). The *dorsal* Morphogen Gradient Regulates the Mesoderm Determinant *twist* in Early *Drosophila* Embryos. *Genes & Development* 5: 1881-1891.
- JIANG, J., LEVINE, M. (1993). Binding Affinities and Cooperative Interactions with bHLH Activators Delimit Threshold Responses to the Dorsal Gradient Morphogen. *Cell* 72: 741-752.

- JIANG, J., RUSHLOW, C.A., ZHOU, Q., SMALL, S., LEVINE, M. (1992). Individual *dorsal* Morphogen Binding Sites Mediate Activation and Repression in the *Drosophila* Embryo. **EMBO J.** 11: 3147-3154.
- KAISER, K. Y MURRAY, N. E. (1985). The use of phage  $\lambda$  replacement vectors in the construction of representative genomic libraries. **DNA Cloning: A practical approach** 1, 1-47. Ed. D. M. Glover, IRL Press.
- KASAI, Y., NAMBU, J.R., LIEBERMAN, P.M., CREWS, S.T. (1992). Dorsal-Ventral Patterning in *Drosophila* - DNA Binding of *snail* Protein to the *single-minded* Gene. **Proc Natl Acad Sci USA** 89: 3414-3418.
- KASSIS, J. A., S. J. POOLE, D. K. WRIGHT AND P. H. O'FARRELL. (1986). Sequence conservation in the protein coding and intron regions of the *engrailed* transcription unit. **EMBO J.** 5: 3583-3589.
- KASSIS, J.A., DESPLAN, C., WRIGHT, D.K., O'FARRELL, P.H. (1989). Evolutionary Conservation of Homeodomain-Binding sites and Other Sequences Upstream and within the Major Transcription Unit of the *Drosophila* Segmentation Gene *engrailed*. **Mol. and Cell Biol.** 9: 4304-4311.
- KELSH, R., DAWSON, I., AKAM, M. (1993). An Analysis of *Abdominal-B* Expression in the Locust *Schistocerca-Gregaria*. **Development** 117: 293-305.
- KIROV, N., ZHELNIN, L., SHAH, J., RUSHLOW, C. (1993). Conversion of a silencer into a enhancer: evidence for a co-repressor in dorsal mediated repression in *Drosophila*. **EMBO J.** 12: 3193-3199.
- KLINGLER, M., M. ERD• LYI, J. SZABAD AND C. NÜSSLEIN-VOLHARD. (1988). Function of *torso* in determining the terminal anlagen of the *Drosophila* embryo. **Nature** 335: 275.
- LEMOTE, P. K., A. KUROIWA, L. I. FESSLER AND W. J. GEHRING. (1989). The homeotic gene *Sex combs reduced* of *Drosophila*: gene structure and embryonic expression. **EMBO J.** 8: 219-227.
- LEPTIN, M. (1991). *twist* and *snail* As Positive and Negative Regulators During *Drosophila* Mesoderm Development **Genes & Development** 5: 1568-1576.
- LETSOU, A., ALEXANDER, S., ORTH, K., WASSERMAN, S.A. (FEB 91). Genetic and Molecular Characterization of *tube*, a *Drosophila* Gene Maternally Required for Embryonic Dorsoventral Polarity. **Proc Natl Acad Sci USA** 88: 810-814.
- LETSOU, A., ALEXANDER, S., WASSERMAN, S.A. (1993). Domain Mapping of Tube, a Protein Essential for Dorsoventral Patterning of the *Drosophila* Embryo. **EMBO J.** 12: 3449-3458.
- LOBE, C.G., GRUSS, P. (1990). Mouse Relatives of *Drosophila* Developmental Control Genes. **Genetics of Pattern Formation**: 223-235.
- MACDONALD, P. M. AND G. STRUHL. (1988). Cis-acting sequences responsible for anterior localization of *bicoid* mRNA in *Drosophila* embryos. **Nature** 336: 595-598.

- MACDONALD, P.M. (1990). *bicoid* Messenger RNA Localization Signal - Phylogenetic Conservation of Function and RNA Secondary Structure. **Development** 110: 161-171.
- MAIER, D., PREISS, A., POWELL, J.R. (1990). Regulation of the Segmentation Gene *fushi-tarazu* Has Been Functionally Conserved in *Drosophila*. **EMBO J.** 9: 3957-3966.
- MAIER, D., SPERLICH, D., POWELL, J.R. (1993). Conservation and Change of the Developmentally Crucial *fushi-tarazu* Gene in *Drosophila*. **J. Mol. Evol.** 36: 315-326.
- MANIATIS, T., FRISTCH, E. F. Y SAMBROOK, J. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, New York.
- MARFANY, G. (1991). Estudi comparatiu de l'estructura del gen *Adh* a varies espècies de *Drosophila*. Tesis Doctoral. Universitat de Barcelona.
- MASUCCI, J.D., MILTENBERGER, R.J., HOFFMANN, F.M. (1990). Pattern-Specific Expression of the *Drosophila-decapentaplegic* Gene in Imaginal Disks Is Regulated by 3' Cis-Regulatory Elements. **Genes & Development** 4: 2011-2023.
- MAYER AND C. NÜSSLEIN-VOLHARD. (1988). **Genes & Development** 2: 1496-1511.
- MICHAEL, W.M., BOWTELL, D.D.L., RUBIN, G.M. (1990). Comparison of the Sevenless Genes of *Drosophila-Virilis* and *Drosophila-melanogaster*. **Proc Natl Acad Sci USA** 87: 5351-5353.
- MITSIALIS, S. A. AND F. C. KAFATOS. (1985) Regulatory elements controlling chorion gene expression are conserved between flies and moths. **Nature** 317: 453-456.
- MLODZIK, M., A. FJOSE AND W. J. GEHRING. (1988). Molecular structure and spatial expression of a homeobox gene from the *labial* region of the Antennapedia-complex. **EMBO J.** 7: 2569-2578.
- MORATA, G., MACIAS, A., URQUIA, N., GONZALEZ-REYES, A. (1990). Homeotic genes. **Seminars in Cell Biology.** 1: 219-227.
- NORRIS, J.L., MANLEY J.L. (1992). Selective nuclear transport of the *Drosophila* morphogen *dorsal* can be established by a signaling pathway involving the transmembrane protein *Toll* and protein kinase A. **Genes & Development** 6: 1654-1667.
- O'CONNOR, M. B., R. BINARI, L. A. PERKINS AND W. BENDER. (1988). Alternative RNA products from the *Ultrabithorax* domain of the Bithorax complex. **EMBO J.** 7: 435-445.
- PADGGET, R.W., ST JOHNSTON, D., GELBART, W.M. (1987). A transcript from a *Drosophila* pattern gene predicts a protein homologous to the Transforming Growth Factor  $\beta$  family. **Nature** 325: 81-84.
- PAN, D., COUREY, A.J. (1992). The Same dorsal Binding Site Mediates Both Activation and Repression in a Context-Dependent Manner. **EMBO J.** 11: 1837-1842.
- PAN, D., HUANG, J.D., COUREY, A.J. (1991). Functional analysis of the *Drosophila twist* promoter reveals a dorsal-binding ventral activator region. **Genes & Development** 5: 1892-1901.

- PANGANIBAN, G.E.F., REUTER, R., SCOTT, M.P., HOFFMANN, F.M. A (1990) *Drosophila* Growth Factor Homolog, *decapentaplegic*, Regulates Homeotic Gene. Expression Within and Across Germ Layers During Midgut Morphogenesis. *Development* 110: 1041-1050.
- PEREZ-ALONSO, M. (1989). Aislamiento y caracterización molecular del gen *Antennapedia* de *D. subobscura*. Tesis Doctoral. Universitat de València.
- PULTZ, M. A., R. J. DIEDERICH, D. L. CRIBBS AND T. C. KAUFMAN. (1988). The *proboscipedia* locus of the Antennapedia Complex: A molecular and genetic analysis. *Genes & Development* 2: 901-920.
- RANDAZZO, F.M., SEEGER, M.A., HUSS, C.A., SWEENEY, M.A., CECIL, J.K., KAUFMAN, T.C. (1993). Structural Changes in the Antennapedia Complex of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 134: 319-330.
- RAY, R.P., ARORA, K., NUSSLEINVOLHARD, C., GELBART, W.M. (1991). The Control of Cell Fate Along the Dorsal Ventral Axis of the *Drosophila* Embryo. *Development* 113: 35-54.
- REGULSKI, M., N. MCGINNIS, R. CHADWICK AND W. MCGINNIS. (1987). Developmental and molecular analysis of *Deformed*: a homeotic gene controlling *Drosophila* head Development *EMBO J.* 6: 767-777.
- REUTER, R., PANGANIBAN, G.E.F., HOFFMANN, F.M., SCOTT, M.P. (1990). Homeotic Genes Regulate the Spatial Expression of Putative Growth Factors in the Visceral Mesoderm of *Drosophila* Embryos. *Development* 110: 1031-1040.
- ROSS, M.H., TANAKA, A. (1988). Genetic Variability in the German Cockroach. XII: A third Mutant That Suggests Chromosome 9 Carries a Highly Conserved Group of Closely Linked Genes. *J. Hered.* 79: 439-443.
- ROTH, S., HIROMI, Y., GODT, D., NUSSLEINVOLHARD, C. (1991). *cactus*, a Maternal Gene Required for Proper Formation of the Dorsoventral Morphogen Gradient in *Drosophila* Embryos. *Development* 112: 371-388.
- ROTH, S., STEIN, D., NUSSLEINVOLHARD, C. A. (1989). Gradient of Nuclear Localization of the *dorsal* Protein Determines Dorsoventral Pattern in the *Drosophila* Embryo. *Cell* 59: 1189-1202.
- RUSHLOW, C., H. DOYLE, T. HOEY AND M. LEVINE. (1987a). Molecular characterization of the *zerknüllt* region of the Antennapedia gene complex in *Drosophila*. *Genes & Development* 1: 1268-1279.
- RUSHLOW, C., LEVINE, M. (1990). Role of the *zerknüllt* gene in dorsal ventral patterns. *Advances in Genetics* 27: 277-307.
- RUSHLOW, C., M. FRASCH, H. DOYLE AND M. LEVINE. (1987b). Maternal regulation of *zerknüllt*, a homeobox gene controlling differentiation of dorsal tissues in *Drosophila*. *Nature* 330: 583-586.

- RUSHLOW, C.A., HAN, K.Y., MANLEY, J.L., LEVINE, M. (1989). The Graded Distribution of the Dorsal Morphogen Is Initiated by Selective Nuclear Transport in *Drosophila*. *Cell* 59: 1165-1177.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F.Y MANIATIS, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, New York.
- SANGER, F., NICKLEN, S. Y COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- SCHNEUWLY, S., A. KUROIWA, P. BAUMGARTNER AND W. J. GEHRING. (1986). Structural organization and sequence of the homeotic gene *Antennapedia* of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* 5: 733-739.
- SCHÜPBACH, T; WIESCHAUS E. (1989). Female Sterile Mutations on the Second Chromosome of *Drosophila melanogaster*. I. Maternal effect Mutations. *Genetics* 121: 101-117.
- SCOTT, M. P., A. J. WEINER, T. I. HAZELRIGG, B. A. POLISKY, V. PIRROTTA, F. SCALENGHE AND T. C. KAUFMAN. (1983). The molecular organization of the *Antennapedia* locus of *Drosophila*. *Cell* 35: 763-776.
- SEEGER, M.A., KAUFMAN, T.C. Molecular Analysis of the *bicoid* Gene from *Drosophila-pseudoobscura*. Identification of Conserved Domains Within Coding and Noncoding Regions of the *bicoid* Messenger RNA.
- SHELTON, C.A., WASSERMAN, S.A. (1993). *pelle* Encodes a Protein Kinase Required to Establish Dorsoventral Polarity in the *Drosophila* Embryo. *Cell* 72: 515-525.
- SHIMELL, M.J., FERGUSON, E.L., CHILDS, S.R., OCONNOR, M.B. The *Drosophila* Dorsal-Ventral Patterning Gene *tolloid* Is Related to Human Bone Morphogenetic Protein-1. (1991). *Cell* 67: 469-481.
- ST JOHNSTON, R.D., GELBART, W. (1987) *decapentaplegic* transcripts are localized along the dorsal-ventral axis of the *Drosophila* embryo. *EMBO J.* 6: 2785-2791.
- ST. JOHNSTON, D., NUSSLEIN-VOLHARD, C. (1992). The Origin of Pattern and Polarity in the *Drosophila* Embryo. *Cell* 68: 201-219.
- STEIN, D., ROTH, S., VOGELSANG, E., NÜSSLEIN-VOLHARD, C. (1991). The Polarity of the Dorsoventral Axis in the *Drosophila* Embryo Is Defined by an ExtraCellular Signal. *Cell* 65: 725-735.
- STEWART, R. (1987) *dorsal*, an Embryonic Polarity Gene in *Drosophila*, Is Homologous to the Vertebrate Proto-oncogene, *c-rel*. *Science* 238: 692-694.
- STEWART, R., F. J. MCNALLY AND P. SCHEDL. (1984). Isolation of the *dorsal* locus of *Drosophila*. *Nature* 311: 262-264.
- STEWART, R., S. B. ZUSMAN, L. H. HUANG AND P. SCHEDL. (1988). The *dorsal* protein is distributed in a gradient in early *Drosophila* embryos. *Cell* 55: 487-495.

- STJOHNSTON, R.D., HOFFMANN, F.M., BLACKMAN, R.K., SEGAL, D., GRIMAILA, R., PADGETT, R.W., IRICK, H.A., GELBART, W.M. (1990). Molecular Organization of the *decapentaplegic* Gene in *Drosophila-Melanogaster*. *Genes & Development* 4: 1114-1127.
- TAUTZ, D. Y PFEIFLE, C. (1989). A non-radioactive method for the localization of RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene *hunchback*. *Chromosoma* 98, 81-85.
- TEROL, J., PEREZ-ALONSO, M. Y DE FRUTOS, R. (1991). *In situ* localization of the *Antennapedia* gene on the chromosomes of the nine species of the *obscura* group. *Hereditas* 114, 131-139.
- THISSE, B., C. STOETZEL, C. GOROSTIZA-THISSE AND F. PERRIN-SCHMITT. (1988). Sequence of the *twist* gene and nuclear localization of its protein in endomesodermal cells of early *Drosophila* embryos. *EMBO J.* 7: 2175-2183.
- THISSE, B., C. STOETZEL, M. EL MESSAL AND F. PERRIN-SCHMITT. (1987). Genes of the *Drosophila* maternal dorsal group control the specific expression of the zygotic gene *twist* in presumptive mesodermal Cells. *Genes & Development* 1: 709-715.
- THISSE, C., PERRINSCHMITT, F., STOETZEL, C., THISSE, B. (1991). Sequence-Specific Transactivation of the *Drosophila twist* Gene by the *dorsal* Gene Product. *Cell* 65: 1191-1201.
- TREIER, M., C. PFEIFLE AND D. TAUTZ. (1989). Comparison of the gap segmentation gene *hunchback* between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila virilis* reveals novel modes of evolutionary change. *EMBO J.* 8: 1517-1525.
- WANG, B.B., MULLERIMMERGLUCK, M.M., AUSTIN, J., ROBINSON, N.T., CHISHOLM, A., KENYON, C. A. (1993). Homeotic Gene Cluster Patterns the Anteroposterior Body Axis of *C. elegans*. *Cell* 74: 29-42.
- WILDE, C. D. AND M. AKAM. (1987). Conserved sequence elements in the 5' region of the *Ultrabithorax* transcription. unit. *EMBO J.* 6: 1393-1401.
- WOOD, W. D. (1966). Host specificity of DNA produced by *E. coli*: Bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. *J. Mol. Biol.* 16, 118.

Reunido el Tribunal que suscribe, en el día de la fecha,  
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de

D. Javier Toni Alcayde  
la calificación de Apt. cum laude

Valencia, a 10 de Marzo de 1994

El Secretario,

El Presidente

